

**Die Untersuchung von PPAR γ -abhängigen sowie -unabhängigen
Mechanismen der Apoptose-Induktion in T-Zellen und deren
Relevanz bei der Pathogenese der Sepsis**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Mathias Soller

1. Gutachter: HD Dr. Andreas von Knethen
2. Gutachter: Prof. Dr. Timm Anke

Frankfurt, November 2007

Zeichen der Technischen Universität Kaiserslautern im Bibliotheksverkehr: D386

Wissenschaftliche Aussprache am 02.11.2007

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Regine Hakenbeck

1. Gutachter: HD Dr. Andreas von Knethen

2. Gutachter: Prof. Dr. Timm Anke

der Dissertation und der mündlichen Prüfung

-INHALTSVERZEICHNIS-

1	EINLEITUNG	1
1.1	Apoptose und Nekrose in T-Zellen	1
1.1.1	Die Bedeutung der Apoptose	1
1.1.2	Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg	2
1.1.3	Nekrose und Nekrose-ähnlicher Zelltod	5
1.2	Der Transkriptionsfaktor PPARγ	7
1.2.1	Aufbau und Struktur von PPAR γ	7
1.2.2	Die Wirkung von PPAR γ als Transkriptionsfaktor	9
1.2.3	DNA-unabhängige Funktionen von PPAR γ	10
1.2.4	PPAR γ -Liganden	12
1.2.4.1	Natürliche PPAR γ -Liganden	12
1.2.4.2	Synthetische PPAR γ Liganden	13
1.2.4.3	Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione	15
1.2.5	Die Bedeutung von PPAR γ in T-Zellen	17
1.2.5.1	PPAR γ -Expression in T-Zellen	17
1.2.5.2	Die anti-inflammatorische bzw. anti-proliferative Wirkung von PPAR γ in T-Zellen	17
1.2.5.3	Die pro-apoptotische Funktion von PPAR γ in T-Zellen	18
1.3	Sepsis	20
1.3.1	Bedeutung der Sepsis	20
1.3.2	Definition der Sepsis	21
1.3.3	Die Pathophysiologie der Sepsis	21
1.3.4	Die Rolle von PPAR γ bei der Pathogenese der Sepsis	24
1.4	Zielsetzung	26
2	MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	28
2.1	Chemikalien	28
2.2	Standardpuffer und Lösungen	30
2.3	Kits	34
2.4	Antikörper	34
2.4.1	Antikörper für Western-Immunoblotting	34
2.4.2	Antikörper zur Zellisolierung und -analyse	35
2.5	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	35

2.6	Primer	35
2.7	Vektoren	36
2.7.1	pcDNA3 PPAR γ 1 wt	36
2.7.2	pcDNA3 PPAR γ 1 AF2mut	37
2.7.3	p(AOX) ₃ -TK-luc Plasmid	37
2.8	Zelllinien und Bakterienstämme	37
2.9	Mauslinien	38
2.10	Geräte und sonstige Materialien	38
2.11	Software	39
3	METHODEN	41
3.1	Zellkultur	41
3.2	Tiere und Tierhaltung	41
3.3	Isolation und Analyse von primären humanen Zellen aus peripherem Blut	41
3.3.1	Isolation von primären humanen T-Zellen	41
3.3.2	Analyse von Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie	42
3.4	Isolation und Analyse muriner T-Zellen aus der Milz	43
3.4.1	Isolation der murinen Leukozyten aus der Milz	43
3.4.2	Isolation muriner T-Zellen aus der Leukozytenfraktion und Extraktion der genomischen DNA	43
3.5	mRNA-Isolation und PCR-Analysen	43
3.5.1	Isolation der mRNA	43
3.5.2	Reverse Transkription	44
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.5.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	45
3.6	Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR	46
3.7	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	46
3.8	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.9	Hitzeschock-Transformation von Bakterien	47
3.10	Bakterienkultur	48
3.11	Plasmidpräparation	48

3.12	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	48
3.13	Zelltod-Analysen zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose	48
3.13.1	Detektion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_M$	48
3.13.2	Nachweis der Phosphatidylserintranslokation mit Annexin V	49
3.13.3	DAPI-Färbung	49
3.13.4	Nachweis der Cytochrom <i>c</i> -Freisetzung	50
3.14	Western-Immunoblotting	50
3.14.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	50
3.14.2	SDS-PAGE und Proteintransfer auf die Membran	51
3.14.3	Detektion	52
3.15	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	52
3.16	Luziferase-Assay	53
3.17	Isolation von submitochondrialen Partikeln aus dem Rinderherz	53
3.17.1	Präparation der mitochondrialen Membranen aus dem Rinderherz	53
3.17.2	Isolation der submitochondrialen Partikel aus dem Rinderherz	54
3.17.3	Bestimmung der Cytochromgehalte	54
3.18	Messung der Aktivitäten der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette	55
3.18.1	Bestimmung der Komplex I-Aktivität (NADH-Oxidase und NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase)	55
3.18.2	Bestimmung der Komplex II-Aktivität (Succinat-Oxidase und Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase)	55
3.19	Nachweis der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	56
3.20	Bestimmung des relativen ATP-Gehaltes	56
4	ERGEBNISSE	58
4.1	Nachweis der PPARγ-abhängigen Apoptose von T-Zellen im pathophysiologischen Verlauf der Sepsis	58
4.1.1	Identifizierung der Leukozytenverteilung im peripheren Blut von Sepsis-Patienten	58
4.1.2	Die Expression von PPAR γ in T-Zellen aus peripherem Blut septischer Patienten	60
4.1.3	Nachweis der Sensitivierung septischer T-Zellen gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose	62
4.1.4	Identifizierung von potentiellen PPAR γ -Liganden im Plasma von Sepsis-Patienten	64
4.1.5	Etablierung eines Maus-Modells zur Klärung der Rolle von PPAR γ bei der Sepsis-induzierten T-Zelldepletion	67

4.2	Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione in der T-Zelllinie Jurkat durch PPARγ-unabhängige Mechanismen	72
4.2.1	Der Jurkat P ⁺ Klon als Testsystem	72
4.2.2	Charakterisierung der Art des Zelltodes in Jurkat P ⁺ Zellen durch Thiazolidindione	73
4.2.3	Einfluss der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die Zelltod-Induktion	78
4.2.4	Wirkungen von Thiazolidindionen auf die mitochondriale Atmungskette	81
4.2.5	Mechanismen des Thiazolidindion-induzierten Zelltodes	85
5	DISKUSSION	90
5.1	Nachweis der PPARγ-abhängigen Apoptose von T-Zellen im pathophysiologischen Verlauf der Sepsis	90
5.1.1	Verifizierung der Lymphopenie in den gesammelten Blutproben von Sepsis-Patienten	90
5.1.2	Untersuchung der PPAR γ -Expression in T-Zellen septischer Patienten	91
5.1.3	Überprüfung der Sensitivität septischer T-Zellen hinsichtlich der PPAR γ -vermittelten Apoptose	92
5.1.4	Die PPAR γ -Aktivierung in T-Zellen erfolgt durch im Sepsis-Plasma vorliegende Liganden	93
5.1.5	Etablierung des Maus-Sepsis-Modells durch Verwendung einer konditionellen PPAR γ -knock-out-Maus	95
5.2	Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione in der T-Zelllinie Jurkat durch PPARγ-unabhängige Mechanismen	97
5.2.1	Auswahl des Testsystems und der verwendeten TZD-Konzentrationen	98
5.2.2	Verifizierung der cytotoxischen Wirkung von TZDs im Jurkat P ⁺ Klon	99
5.2.3	Die Wirkung von TZDs auf die mitochondriale Atmungskette	99
5.2.4	Auswirkungen der Hemmung der Komplexe I und II auf den Zelltod in Jurkat P ⁺ Zellen	100
5.2.5	Mögliche Mechanismen der Zelltod-Induktion nach Ciglitazon- bzw. Troglitazon-Inkubation	102
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
ANHANG		
A1 Danksagung		
A2 Curriculum vitae		
A3 Publikationen		
A4 Erklärung		

-ABBILDUNGSVERZEICHNIS-

Abb. 1:	<i>Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg.</i>	3
Abb. 2:	<i>Struktur von PPARγ.</i>	8
Abb. 3:	<i>Die PPARγ-vermittelte Genexpression.</i>	9
Abb. 4:	<i>Die PPARγ-abhängige Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression.</i>	11
Abb. 5:	<i>Strukturformeln ausgewählter natürlicher Liganden von PPARγ.</i>	13
Abb. 6:	<i>Die chemische Struktur der TZDs.</i>	15
Abb. 7:	<i>Auswirkungen der PPARγ-Aktivierung in T-Zellen.</i>	19
Abb. 8:	<i>Die Pathogenese der Sepsis.</i>	23
Abb. 9:	<i>Analyse der Leukozytenpopulationen in peripherem Blut von Sepsis-Patienten und gesunden Spendern.</i>	60
Abb. 10:	<i>Die mRNA-Expression von PPARγ in T-Zellen septischer Patienten und in gesunden Spendern.</i>	61
Abb. 11:	<i>PPARγ-vermittelte Apoptose in T-Zellen septischer Patienten.</i>	63
Abb. 12:	<i>Plasma von Sepsis-Patienten aktiviert das PPARE in Jurkat T-Zellen.</i>	65
Abb. 13:	<i>Das Plasma von Sepsis-Patienten induziert PPARγ-vermittelte Apoptose in Jurkat T-Zellen.</i>	66
Abb. 14:	<i>Verpaarungsschema zur Zucht von lck-Cre;PPAR$\gamma^{fl/fl}$-Mäusen als konditionelle PPARγ-knock-out-Mäuse.</i>	68
Abb. 15:	<i>Genotypisierung der gewünschten lck-Cre;PPAR$\gamma^{fl/fl}$-Maus mittels PCR.</i>	69
Abb. 16:	<i>Überprüfung der Deletion in den lck-Cre;PPAR$\gamma^{fl/fl}$-Mäusen.</i>	70
Abb. 17:	<i>Analyse der PPARγ-mRNA-Expression in der T-Zelllinie Jurkat.</i>	73
Abb. 18:	<i>Die TZD-induzierte Zelltod-Induktion in Jurkat P Zellen.</i>	74
Abb. 19:	<i>Charakterisierung des Zelltodes nach Inkubation mit TZDs.</i>	75
Abb. 20:	<i>Troglitazon induziert die Freisetzung von Cytochrom c, wohingegen der Ciglitazon-induzierte Zelltod unabhängig von der Cytochrom c-Freisetzung verläuft.</i>	77
Abb. 21:	<i>Relative ROS-Produktion infolge von Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon in Jurkat P Zellen.</i>	78
Abb. 22:	<i>Die Ciglitazon-induzierte Nekrose in Jurkat P Zellen ist ROS und H₂O₂-abhängig, wogegen die Troglitazon-abhängige Apoptose nur marginal ROS-vermittelt abläuft.</i>	80
Abb. 23:	<i>TZDs hemmen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette.</i>	82
Abb. 24:	<i>Ciglitazon und Troglitazon hemmen im Gegensatz zu Rosiglitazon den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette.</i>	84
Abb. 25:	<i>Die Hemmung der Komplexe I und II führt zur Induktion der Apoptose in Jurkat P Zellen.</i>	85
Abb. 26:	<i>Ciglitazon reduziert den ATP-Gehalt in Jurkat P Zellen.</i>	86

<i>Abb. 27: Die Erniedrigung des ATP-Gehaltes in Jurkat P Zellen führt zusammen mit der Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette zur Induktion einer Nekrose anstatt Apoptose.</i>	87
<i>Abb. 28: Zusammenfassung der PPARγvermittelten Apoptose in T-Zellen während der Sepsis.</i>	95
<i>Abb. 29: Zusammenfassung der TZD-vermittelten, PPARγunabhängigen Effekte durch die TZDs Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon.</i>	104

-TABELLENVERZEICHNIS-

<i>Tab. 1: Leukozytenverteilung in peripherem Blut von Kontroll-Spendern im Vergleich zu Sepsis-Patienten</i>	59
---	----

-ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS-

α	Anti
2-DG	2-Deoxy-Glukose
9-HODE	9-Hydroxyoktadekadien-Säure
13-HODE	13-Hydroxyoktadekadien-Säure
15d-PGJ ₂	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂
Abb.	Abbildung
ACAD	Aktivierungs-autonomer Zelltod, (,activated T cell autonomous death')
AF	Aktivierende Funktion
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod, (,activation-induced cell death')
AP-1	Aktivierendes Protein-1
Apaf-1	,apoptotic protease activating factor-1'
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
AUC	,area under the curve'
BH	Bcl-2 Homologie-Domänen
BHA	,butylated hydroxyanisole'
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, (,bovine serum albumin')
CARS	kompensatorisches anti-inflammatorisches Reaktions-Syndrom (,compensatory anti-inflammatory response syndrome')
CD	,cluster of differentiation'
cDNA	komplementäre DNA, (,complementary DNA')
CIG	Ciglitazon
CLP	,cecal ligation and puncture'
COX	Cyclooxygenase
Cre	,cyclization recombinase'
CREB	,cAMP responsive element binding protein'
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
DAPI	4',6'-Diamin-2-Phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DBQ	n-Decylubiquinon
DCIP	Dichlorphenolindophenol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DD	Todesdomäne, („death domain“)
DiOC ₆ (3)	3,3′-Dihexyloxacarbocyaninjodid
DISC	„death-inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
d/n	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\Psi_M$	Mitochondrienmembranpotential
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	„Ethylenglycoltetraaceticacid“
Ex/Em	Excitation/Emission [nm]
FADD	„Fas-associated death domain“
Fas	„Fibroblast associated“
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum, („fetal calf serum“)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fl	floxed
FLICE	„FADD-like IL-1 converting enzyme“
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
H ₂ DCF-DA	2′,7′-Dichlorodihydrofluoreszein
HD	Hinge-Domäne
HDAC3	Histondeacetylase-3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
IAPs	„inhibitor of apoptosis proteins“
IFN γ	Interferon γ
IKK	inhibitorische- κ B-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MnTBAP	Mn(III)-tetrakis-(4-Benzoessäure)-porphyrin-chlorid

MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOMP	„mitochondrial outer membrane permeabilization“
mRNA	Messenger-RNA
NAC	N-Acetyl-Cystein
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCoR/SMRT	„nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors“
NFAT	„Nuclear factor of activated T cells“
NF- κ B	„Nuclear factor-kappa B“
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	„nitric oxide“
OD	optische Dichte
oxLDL	„oxidized low density lipoprotein“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“
PCD	programmierter Zelltod, („programmed cell death“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, („polymerase-chain-reaction“)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PKC α	Protein-Kinase C α
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PPAR	„peroxisome proliferator activated receptor“
PPRE	„PPAR response element“
PS	Phosphatidylserin
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIP	„receptor interacting protein“
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, („reactive oxygen species“)
ROSI	Rosiglitazon
Rot	Rotenon

RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptor
S.D.	Standardabweichung, (,standard deviation')
S.E.	Standardfehler, (,standard error')
SIRS	systemisches inflammatorisches Reaktions-Syndrom
SMP	submitochondriale Partikel
SRC1	,steroid receptor co-activator 1'
STS	Staurosporin
SOD	Superoxiddismutase
SUMO	,small ubiquitin-like modifier'
Tab.	Tabelle
tBid	,truncated Bid'
TBL1	,transducin beta-like protein 1'
TEMED	Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
T _H 1 bzw. 2	T-Helferzelle Typ 1 bzw. 2
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TRO	Troglitazon
TTFA	2-Theonyltrifluoroacetone
TZD	Thiazolidindion
TZR	T-Zell-Rezeptor
WY14643	Pikrinsäure
XIAP	,X linked IAP'

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose und Nekrose in T-Zellen

1.1.1 Die Bedeutung der Apoptose

Der programmierte Zelltod ist ein genetisch determinierter Prozess, der zur kontrollierten Selbstzerstörung einer Zelle führt. Kerr et al. bezeichneten diesen Vorgang mit dem aus dem Griechischen stammenden Begriff Apoptose, der das Herabfallen der Blätter von den Bäumen im Herbst bezeichnet [1]. Er soll verdeutlichen, dass der programmierte Zelltod, wie die Mitose, einen zentralen Mechanismus der Zellhomöostase eines multizellularen Organismus darstellt. Typische morphologische Kennzeichen der Apoptose sind die Zellschrumpfung, die Entwicklung von blasenförmigen Gebilden an der Zelloberfläche („membrane blebbing“), die Chromatinkondensation und schließlich, durch Abschnürungen der Zellmembran, die Bildung apoptotischer Körperchen („apoptotic bodies“). Die apoptotischen Körperchen weisen, neben einer intakten Zellmembran, auf ihrer Oberfläche auch Signalmoleküle wie z. B. das Phosphatidylserin auf. Diese werden von Phagozyten erkannt und es kommt *in vivo* dadurch normalerweise zu einer schnellen, sicheren Entsorgung [2].

Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von T-Zellen, die sehr wichtige Regulatoren des Immunsystems darstellen. So werden z. B. im Thymus heranreifende T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, durch Apoptose entfernt, um Autoimmunität zu vermeiden. Auch im Blutkreislauf zirkulierende T-Zellen unterliegen einer strengen Regulation durch Apoptose, denn infolge eines Antigen-Kontaktes kommt es zur verstärkten Differenzierung und Proliferation der T-Zellen. Nach erfolgreicher Bekämpfung des entsprechenden Antigens müssen allerdings diese Antigen-spezifischen T-Zellen durch kontrollierte Prozesse, wie der Apoptose, entfernt werden, um wiederum die Entwicklung einer Autoimmunität zu verhindern sowie zum Erhalt der T-Zell-Homöostase beizutragen [3].

Bei der Apoptose Antigen-aktivierter T-Zellen werden prinzipiell zwei Arten des Zelltodes unterschieden: Beim so genannten Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD ‚activation-induced cell death‘), der an T-Zell-Rezeptor (TZR)-vermittelte Signalwege gekoppelt ist, kommt es zur Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalweges (1.1.2), der über die Todesliganden/Todesrezeptoren-Paare initiiert wird. Im Gegensatz dazu ist die zweite Form des Zelltodes infolge einer Antigen-Aktivierung, der Aktivierungs-autonome Zelltod der T-

Zellen (ACAD ‚activated T cell autonomous death‘), weniger gut charakterisiert. Er tritt im Gegensatz zum AICD nicht aufgrund T-Zell-Rezeptor-vermittelter Signalwege auf, sondern vor allem bei Änderungen im Cytokinprofil. Beim ACAD spielen vor allem die Proteine der Bcl-2-Familien-Mitglieder eine zentrale Rolle, die über Interaktionen mit dem Mitochondrium den intrinsischen Apoptose-Signalweg (1.1.2) induzieren können. Die Mechanismen des extrinsischen und intrinsischen Signalweges sollen im Folgenden näher dargestellt werden.

1.1.2 Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg

Beim extrinsischen Apoptose-Signalweg (Abb. 1) kommt es zur Bindung von Todesliganden an die so genannten Todesrezeptoren. Die Todesliganden/Todesrezeptoren-Paare gehören zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren zu der FasL/Fas (auch Apo-1, CD95 oder TNFRSF6 genannt), TRAIL/DR4 bzw. DR5 und TNF α /TNF-R1 zählen. Die Todesrezeptoren besitzen im cytoplasmatischen Teil eine Todes-Domäne (DD ‚death domain‘), die nach Bindung von Todesliganden eine Rekrutierung verschiedener Adaptorproteine, wie z. B. FADD (‚Fas-associated death domain‘) und der Procaspase-8, welche die inaktive Proform der Caspase-8 darstellt, ermöglicht. Der nun entstandene DISC (‚death-inducing signaling complex‘) führt zur Freisetzung der aktiven Caspase-8, welche auch als FLICE (‚FADD-like IL-1 converting enzyme‘) bezeichnet wird. Die nun aktive Caspase-8 initiiert eine Signalkaskade in deren Folge die Effektor-Caspasen, zu denen u. a. die Caspasen-3, -6 und -7 gehören, aktiviert werden. Diese initiieren über die Spaltung verschiedener Substrate, wie z. B. DNA Reparatur-Enzyme, zelluläre und nukleäre Strukturproteine oder Endonuklease-Inhibitoren, die Ausführung des apoptotischen Programmes [3].

Beim intrinsischen Apoptose-Signalweg spielt das Mitochondrium die zentrale Rolle (Abb. 1). Durch einen apoptotischen Stimulus wie z. B. Cytokin-Entzug, DNA-Schaden oder Strahlung, kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP ‚mitochondrial outer membrane permeabilization‘), welche die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum ermöglicht und die Ausführung des apoptotischen Programmes startet. Die MOMP wird hauptsächlich durch die Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie reguliert, die bis zu vier konservierte, so genannte Bcl-2 Homologie-Domänen (BH1 bis BH4) besitzen. Aufgrund dieser BHs werden die Bcl-2-Familien-Mitglieder in Gruppen eingeteilt, wobei man zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familien-Mitgliedern unterscheidet. Die anti-apoptotische Gruppe mit den Mitgliedern Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1

zeichnet sich durch drei bis vier gemeinsame BH-Domänen aus. Die pro-apoptotische Gruppe spaltet sich in zwei weitere Teile auf: Zum einen die Mitglieder, die zwei bis drei BH-Domänen teilen, wie z. B. Bax, Bak, Bcl-x_s und die BH3-only Mitglieder, wie z. B. Bad, Bid, Bim, Bik, Noxa und Puma, welche nur die BH3-Domäne als gemeinsames Gruppenmerkmal aufweisen [3].

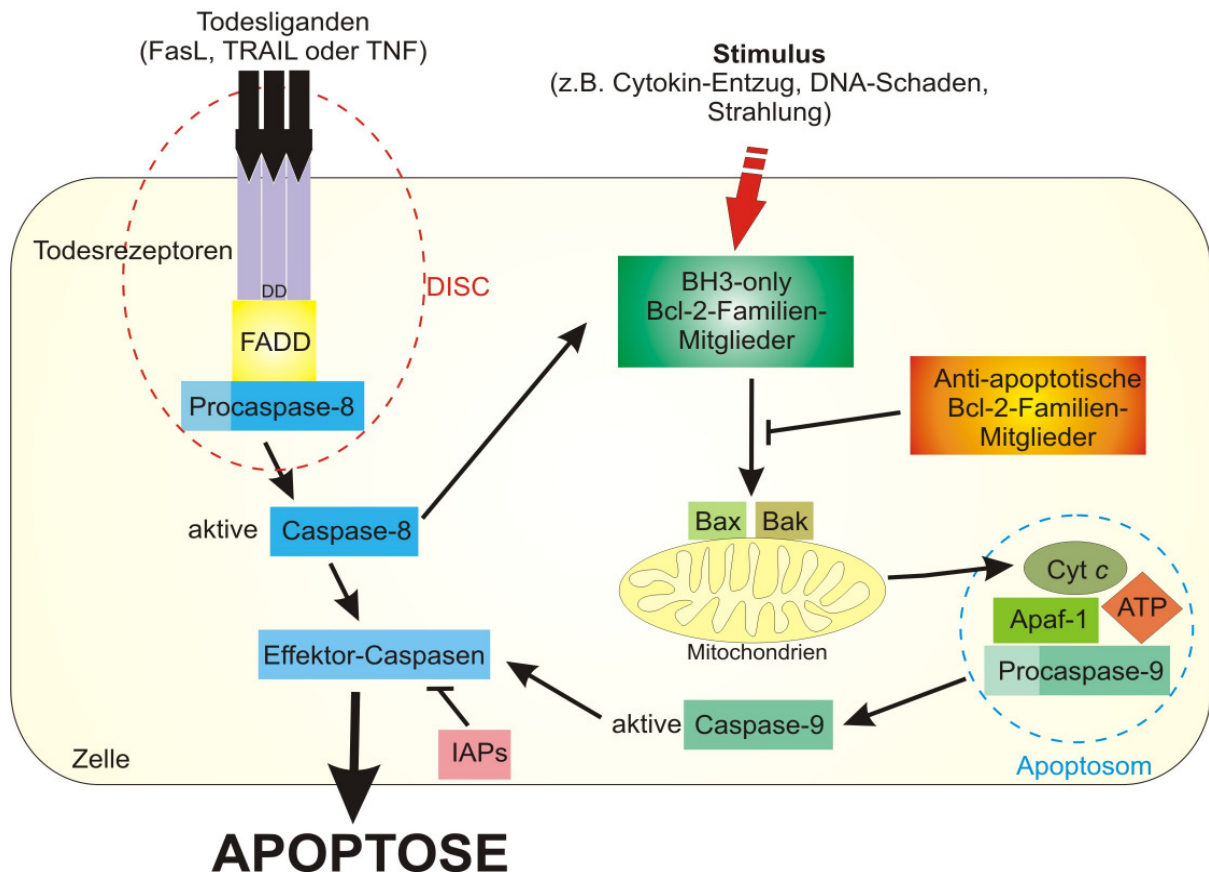


Abb. 1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg. Der extrinsische Signalweg, auf der linken Seite der Abbildung erfolgt über Todesliganden-Bindung an die Todesrezeptoren, welche im cytoplasmatischen Teil Todesdomänen (DD) besitzen, an die Adaptorproteine wie das FADD („Fas-associated death domain“) binden. Durch die Bindung der Procaspase-8 an FADD entsteht der DISC („death-inducing signaling complex“) (rot-gestrichelt umkreist), welcher die Aktivierung der Caspase-8 bewirkt. Nach einem Stimulus wie z. B. Cytokin-Entzug, DNA-Schaden oder Strahlung, wird der intrinsische Signalweg (auf der rechten Seite der Abbildung) aktiviert, der über die Aktivierung von BH3-only Bcl-2-Familien-Mitgliedern verläuft. Dabei wird vor allem über die Bax- und Bak-Aktivierung Cytochrom *c* aus dem Mitochondrium in das Cytosol freigesetzt. Dieses Cytochrom *c* bildet zusammen mit Apaf-1 („apoptotic protease activating factor 1“), ATP und der Procaspase-9 das Apoptosom (blau-gestrichelt umkreist) aus, welches die Caspase-9 aktiviert. Anti-apoptotische Bcl-2-Familien-Mitglieder hemmen dagegen die BH3-only Bcl-2-Familien-Mitglieder, wodurch die Freisetzung von Cytochrom *c* verhindert wird. Die aktivierten Caspasen-8 und -9 aktivieren wiederum die Effektor-Caspasen, welche das apoptotische Programm ausführen, jedoch durch IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“) inhibiert werden können.

In den meisten Zelltypen scheinen die pro-apoptotischen Mitglieder Bax und Bak eine zentrale Rolle bei der Initiation der MOMP zu spielen, da Zellen, bei denen diese zwei Proteine ausgeschaltet wurden, resistent gegenüber der mitochondrial-vermittelten Apoptose sind [4, 5]. Die Aktivierung von Bax und Bak kann z. B. über die Interaktion mit den pro-apoptotischen BH3-only Bcl-2-Familien-Mitgliedern erfolgen. Dahingegen können die anti-apoptotischen Bcl-2-Familien-Mitglieder die Aktivierung von Bax und Bak direkt verhindern. Sie können allerdings auch die pro-apoptotischen BH3-only Proteine inhibieren und somit ebenfalls indirekt die Bax- und Bak-Aktivierung hemmen und damit schließlich die Apoptose-Induktion verhindern. Es liegt also eine sehr komplexe Regulation der Apoptose-Induktion über die Bcl-2-Familien-Mitglieder vor, wobei die Balance zwischen den Aktivitäten pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Bcl-2-Familien-Mitglieder entscheidet, ob eine Bax- und Bak-vermittelte MOMP als Apoptose einleitendes Signal induziert wird [3]. Kommt es nun zur MOMP wird Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytosol freigesetzt, wo es zusammen mit dem Adaptorprotein Apaf-1 (,apoptotic protease activating factor 1'), ATP und der Procaspase-9 den so genannten Apoptosom-Komplex ausbildet. Dieser Multiproteinkomplex bewirkt letztlich die Aktivierung der Caspase-9, die ihrerseits die Effektor-Caspasen aktiviert, welche, wie bereits beim extrinsischen Signalweg beschrieben, den strukturellen Abbau der Zelle veranlassen. Allerdings gibt es auch Mechanismen die nach der Caspase-Aktivierung die Ausführung der Apoptose beeinflussen können. Hierbei spielen vor allem Proteine der Familie der IAPs (,inhibitor of apoptosis proteins') eine wichtige Rolle. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Überlebens-fördernde Protein XIAP (,X-linked IAP'), welches sehr effektiv die Caspasen-3 und -7 hemmt und damit auch die Ausführung der Apoptose, verstärkt in humanen Tumoren exprimiert ist [6, 7].

Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg werden zwar unabhängig voneinander beschrieben, allerdings konnte, abhängig vom Zelltyp und dem apoptotischen Stimulus, eine Vernetzung dieser beiden Signalwege nachgewiesen werden. So kann die durch den extrinsischen Signalweg aktivierte Caspase-8 auch zur Spaltung des Proteins Bid aus der BH3-only Familie führen. Das dadurch entstehende Fragment tBid (,truncated Bid') induziert die Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem mitochondrialen Intermembranraum, wodurch nun die Caspase-9 und damit der intrinsische Apoptose-Signalweg aktiviert wird [8]. Diese Quervernetzung führt dazu, dass die Apoptose-Induktion häufig nicht auf die ausschließliche Aktivierung des extrinsischen bzw. intrinsischen Signalwegs zurückgeführt werden kann.

Infolge der Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-Kontakt wird Apoptose induziert. Abhängig vom induzierten Apoptose-Signalweg, wird dabei in AICD, d. h. Aktivierungs-induzierter Zelltod und ACAD, d. h. Aktivierungs-autonomer Zelltod unterschieden, wie es beispielsweise in verschiedenen T-Zell-Subpopulationen der Fall ist. $CD4^+$ T-Zellen, d. h. T-Helferzellen, differenzieren je nach Cytokinmilieu in T-Helferzellen Typ 1 (T_H1), welche sich durch ihre $IFN\gamma$ (Interferon γ)-Produktion auszeichnen und T-Helferzellen Typ 2 (T_H2), die vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Beide T-Helferzell-Subtypen weisen eine Apoptose-Induktion infolge der Antigen-Aktivierung auf. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in den T_H1 der für den AICD typische extrinsische Apoptose-Signalweg über das FasL/Fas-System induziert wird, welcher jedoch bei den T_H2 keine Rolle spielte [3]. Neuere Studien zeigen, dass in T_H2 das Granzym B an der Aktivierungs-induzierten Apoptose beteiligt ist [9]. Das Granzym B kann, als Serin-Protease, direkt die Caspasen-3, -8 und andere Substrate, wie Bid spalten, wodurch es zur Aktivierung des apoptotischen Programmes kommt. Dies zeigt, dass eine Induktion der Apoptose auch auf anderen als den beschriebenen extrinsischen und intrinsischen Wegen induziert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der nach Antigen-Aktivierung induzierte Zelltod in T-Zellen zudem Caspase-unabhängig erfolgen kann [10]. In diesem Fall führt die Aktivierung des BH3-only Proteins Bim auf Fas- und TNF-unabhängigen Signalwegen zum Zelltod auch in Abwesenheit von Caspasen [11]. Diese Art der T-Zell-Apoptose wird dem Aktivierungs-autonomen Zelltod (ACAD) zugeordnet, da BH3-only Mitglieder, als wichtige Komponenten des intrinsischen Apoptose-Signalweges, involviert sind. Beim ACAD muss somit nicht zwingend der intrinsische Apoptose-Signalweg, wie er oben beschrieben wurde, erfolgen. Es existieren also auch Arten des Zelltodes, die nicht auf klassischen Wegen der Apoptose, d. h. über die Caspase-Aktivierung verlaufen, aber dennoch einer Regulation unterliegen. Hierfür wurde der Überbegriff PCD ‚programmed cell death‘ eingeführt, der auch Zelltod-Arten mit einschließt, die z. B. eher nekrotischen Charakter aufweisen.

1.1.3 Nekrose und Nekrose-ähnlicher Zelltod

Die klassische Nekrose tritt auf, wenn es vor allem durch äußere Einflüsse wie Verbrennung, Vergiftung, Strahlung oder mechanische Reize zum Anschwellen und Platzen der Zelle kommt. Durch den bei der Nekrose austretenden Zellinhalt kann es im Gegensatz zum apoptotischen Zelltod zu sehr starken Entzündungen des umliegenden Gewebes kommen. Ein nekrotischer Zelltod kann allerdings auch durch zelluläre Prozesse induziert werden, wobei jedoch ein morphologischer Unterschied zur klassischen Nekrose nicht nachgewiesen werden

kann. Man nennt diese Form des Zelltodes Nekrose-ähnlicher Zelltod („necrosis-like PCD“), bei dem, vergleichbar mit der klassischen Nekrose, z. B. keine Chromatinkondensation auftritt. Die Zelle verliert dabei aber ebenso ihre Membranintegrität, es kommt zum Austritt des Zellinhaltes, und somit zu einer Entzündungsreaktion. Im Gegensatz zur klassischen Nekrose kann der Nekrose-ähnliche Zelltod, da er auf zellulären Prozessen beruht, z. B. durch Sauerstoff-Radikal-Fänger, Hemmung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase, Bcl-2-Überexpression sowie durch Mutationen in intrazellulären Signalmolekülen und durch Protease-Inhibitoren gehemmt werden [12]. Die zellulären Prozesse, die in den Nekrose-ähnlichen Zelltod involviert sind, spielen jedoch zum Großteil auch beim Ablauf der klassischen Apoptose eine Rolle, weshalb Apoptose-typische Merkmale wie Phosphatidylserin-Exposition, Zellschrumpfung usw. bis zu einem bestimmten Grad auch bei dem Nekrose-ähnlichen Zelltod auftreten können.

Die Produktion von ROS spielt offensichtlich eine zentrale Rolle beim Nekrose-ähnlichen Zelltod. Dies zeigte sich bei dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- bzw. Fas-vermittelten Nekrose-ähnlichen Zelltod in Jurkat T-Zellen, welcher durch den Sauerstoff-Radikal-Fänger BHA („butylated hydroxyanisole“) inhibiert werden konnte. Dabei wird vermutet, dass die erhöhte ROS-Produktion durch TNF auf einen stark erhöhten Elektronenfluss durch die mitochondriale Atmungskette zurückzuführen sein könnte [13, 14]. Die genauen Signalwege, über die ROS letztlich den Nekrose-ähnlichen Zelltod induzieren, sind jedoch noch nicht im Detail geklärt. Allerdings scheinen das mit dem TNF-Rezeptor-interagierende-Protein RIP („receptor-interacting protein“), und, zumindest im Falle des Fas-vermittelten Nekrose-ähnlichen Zelltodes, das mit dem DISC interagierende Adaptorprotein FADD („Fas-associated death domain“) beteiligt zu sein [12]. Hierbei wird postuliert, dass die RIP-Kinase-Aktivität vermutlich zur Phosphorylierung eines unbekanntes Faktors führt, der für die Nekrose-Induktion verantwortlich ist [15, 16]. Generell scheint die Produktion von ROS ein wichtiger Faktor bei der Induktion des Zelltodes in T-Zellen zu sein. Dies zeigt sich beispielsweise beim ACAD. Dieser wird durch die Aktivierung der T-Zellen *in vivo* gefolgt von einer kurzzeitigen Kultivierung *in vitro* induziert. Dabei sterben die T-Zellen unabhängig von Fas- und TNF-induzierten Signalwegen, d. h. der AICD, als extrinsischer Signalweg, ist ausgeschlossen. Durch die Inkubation so behandelte T-Zellen mit dem Antioxidans MnTBAP (Mn(III)-tetrakis-(4-Benzoesäure)-porphyrin-chlorid), einem Superoxiddismutase-Mimetikum, konnte der ACAD inhibiert werden [10]. Diese T-Zellen weisen auch stark erhöhte Mengen an ROS auf, wodurch deren Funktion als wichtige Induktoren des Zelltodes in T-Zellen unterstützt wird.

Ob nun Apoptose oder Nekrose induziert wird, hängt entscheidend vom internen ATP-Gehalt der Zelle ab. Der strukturelle Abbau der Zelle bei der Apoptose ist ein aktiver Prozess, für dessen korrekten Ablauf eine bestimmte Menge an Energie, in Form von ATP, zur Verfügung stehen muss. Dieser Zusammenhang wurde auch in Studien von Leist et al. in Jurkat T-Zellen bestätigt, in denen die Inkubation mit den klassischen Apoptose-Induktoren α -CD95 bzw. STS Nekrose induzierte, wenn die ATP-Konzentration um $\geq 50\%$ vermindert war [17].

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass eine eindeutige Unterscheidung in Apoptose und Nekrose nicht immer möglich ist. Es können auch Mischformen auftreten. In T-Zellen können verschiedene Arten des Zelltodes mit Caspase-abhängigem, apoptotischem bzw. Caspase-unabhängigem, nekrotischem Charakter induziert werden. Für den Organismus könnte dies von Vorteil sein, da unter Bedingungen wie z. B. Abwesenheit bzw. Inaktivität von Caspasen durch Mutationen eine Entsorgung von ungewollten bzw. sogar schädlichen Zellen immer noch möglich wäre.

1.2 Der Transkriptionsfaktor PPAR γ

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Transkriptionsfaktor ‚peroxisome proliferator-activated receptor γ ‘ (PPAR γ), welcher als wichtiger anti-inflammatorischer aber auch pro-apoptotischer Faktor in T-Zellen identifiziert wurde. Ich habe mich vor allem mit dessen Fähigkeit zur Apoptose-Induktion bzw. auch der direkten PPAR γ -unabhängigen, cytotoxischen Wirkung seiner Liganden beschäftigt. Aus diesem Grund soll das Protein PPAR γ im Folgenden näher vorgestellt werden.

Die Familie der PPARs (‚peroxisome proliferator-activated receptors‘), bestehend aus den bisher identifizierten Isoformen PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ , gehört zu den Liganden-aktivierten nukleären Hormonrezeptoren [18, 19]. PPAR γ wurde als wichtiger Regulator der Adipozytendifferenzierung und des Glukose-Metabolismus identifiziert [20], wodurch dessen erhöhte Expression im Fettgewebe erklärt werden kann [21]. In neueren Studien rücken jedoch die anti-inflammatorischen [22-24] und pro-apoptotischen Wirkungen von PPAR γ [25-28] immer mehr in den Vordergrund.

1.2.1 Aufbau und Struktur von PPAR γ

Beim Menschen konnten bisher vier verschiedene Spleiß-Varianten von PPAR γ nachgewiesen werden, welche zur Translation von zwei verschiedenen PPAR γ -Protein-

Isoformen (PPAR γ 1 und PPAR γ 2) führen. Dies legt eine streng kontrollierte, Gewebespezifische Expression nahe [29]. PPAR γ 1, welches hauptsächlich in Immunzellen exprimiert wird [22, 26], besteht aus 475 Aminosäuren, wohingegen PPAR γ 2 am N-Terminus 28 weitere Aminosäuren aufweist. Das PPAR γ -Protein ist in fünf Domänen unterteilt, die auch typisch für die Familie der nukleären Hormonrezeptoren sind (Abb. 2).



Abb. 2: Struktur von PPAR γ 1. Die Struktur von PPAR γ zeigt den für nukleäre Hormonrezeptoren typischen Aufbau aus fünf Domänen. Die Domänen C, DNA-Bindungsdomäne (DBD), und E, Liganden-Bindungsdomäne (LBD) sind am stärksten konserviert. Die Amino-terminal gelegene A/B-Domäne stellt die Liganden-unabhängige Aktivierungsdomäne AF1 (,activation function 1') dar, die Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne (AF2) befindet sich dagegen in der Region F zusammen mit der LBD (Region E) am C-terminalen Teil des PPAR γ -Proteins. Die Domäne D besteht aus einer variablen Hinge-Domäne (HD) und spielt bei Konformationsänderungen eine wichtige Rolle.

Die Struktur von PPAR γ 1 wurde von Nolte et al. mittels der Röntgen-Raman-Streuungsmethode aufgeklärt. Der N-Terminus besteht aus der Liganden-unabhängigen Aktivierungsdomäne [A/B], auch als AF1 (,activation function 1') bezeichnet, gefolgt von der DNA-Bindungsdomäne (DBD), bestehend aus zwei Zink-Finger-Motiven [C]. Diese Domäne erlaubt es dem Protein mit der DNA zu interagieren und an das entsprechende Bindungsmotiv im Promotor, das so genannte PPRE (,PPAR response element') zu binden. Der DNA-Bindungsdomäne folgt die Hinge-Domäne (HD) [D], welche dem Protein eine Flexibilität hinsichtlich der Fähigkeit zur Liganden- und DNA-Bindung ermöglicht. Weiterhin ist diese Domäne auch in der Lage mit anderen Proteinen eine direkte Protein-Interaktion einzugehen. Dadurch wird PPAR γ in die Lage versetzt, auch unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, verschiedene Signalwege zu beeinflussen (siehe 1.2.3). Am C-Terminus des PPAR γ -Proteins befindet sich die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) [E], an die der Ligand binden kann, sowie die Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne AF2 (,activation function 2') [F] [30].

1.2.2 Die Wirkung von PPAR γ als Transkriptionsfaktor

Die Rolle von PPAR γ bei der Adipozytendifferenzierung und im Glukose-Metabolismus beruht vor allem auf der Induktion entsprechender Gene durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Zur Aktivierung von PPAR γ muss die Bindung eines Liganden (1.2.4) an die Liganden-Bindungsdomäne, sowie die Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), der ebenfalls durch einen Liganden aktiviert wird, erfolgen. RXR gehört, wie PPAR γ , zu den nukleären Hormonrezeptoren.

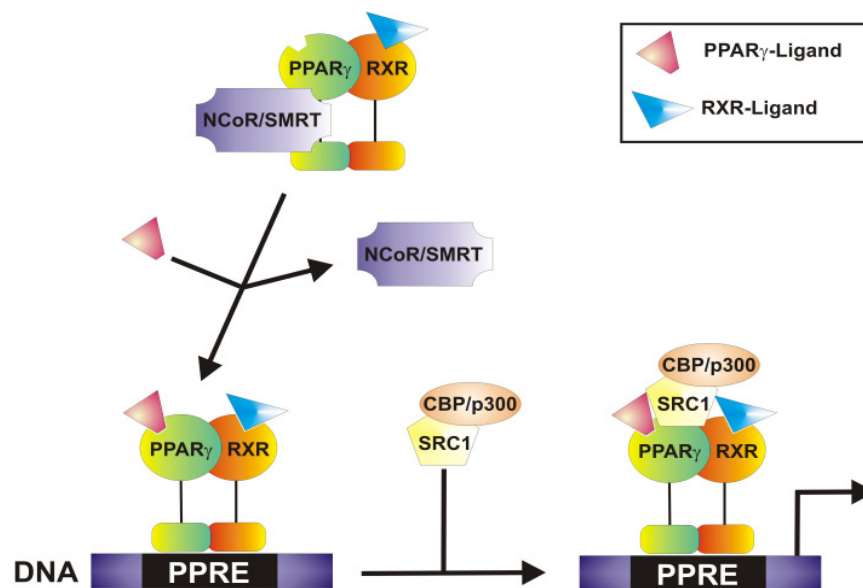


Abb. 3: Die PPAR γ -vermittelte Genexpression. Die Bindung eines Liganden (1.2.4) an die Liganden-Bindungsdomäne von PPAR γ führt zur Ausbildung eines Heterodimers mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), der bereits durch einen Liganden aktiviert wurde. Weiterhin bewirkt die Bindung des Liganden an PPAR γ die Dissoziation des Corepressorkomplexes (NCoR/SMRT, nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) vom Heterodimer PPAR γ /RXR. Durch die Dissoziation dieses Corepressorkomplexes NCoR/SMRT wird das PPAR γ /RXR-Heterodimer in die Lage versetzt an das PPRE im entsprechenden Promotorbereich zu binden. Zur vollständigen Transaktivierung werden mehrere Coaktivatoren, wie z.B. SRC1 (steroid receptor co-activator 1) und CBP (cAMP response element (CREB)-binding protein)/p300 rekrutiert. Diese Coaktivatorkomplexe reorganisieren durch ihre Histonacetyltransferaseaktivität die Chromatinverpackung und erlauben so der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zur Promotorregion, wodurch die Transkription PPAR γ -gesteuerter Gene gestartet wird.

Wie in Abb. 3 dargestellt, kommt es durch die Bindung eines Liganden an PPAR γ zur Dissoziation des Corepressorkomplexes (NCoR/SMRT, nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) vom PPAR γ /RXR-Heterodimer. NCoR/SMRT verhindert durch die Assoziation mit Histondeacetylasen die Gentranskription. Die Liganden-induzierte Dissoziation des Corepressorkomplexes

NCoR/SMRT führt nun dazu, dass das PPAR γ /RXR-Heterodimer an sein Bindemotiv im entsprechenden Promotorbereich, das PPRE, binden kann. Zur vollständigen Transaktivierung werden mehrere Coaktivatoren, wie z.B. SRC1 (,steroid receptor co-activator 1') und CBP (,cAMP response element (CREB)-binding protein')/p300 rekrutiert. Diese Coaktivatorkomplexe reorganisieren durch ihre Histonacetyltransferaseaktivität die Chromatinverpackung, und erlauben so der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zur Promotorregion [31]. Ein prominentes Zielgen von PPAR γ ist der auf Makrophagen exprimierte CD36-Rezeptor, welcher u. a. eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von oxLDL (,oxidized low density lipoprotein') in die Zelle und damit bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt [32].

1.2.3 DNA-unabhängige Funktionen von PPAR γ

Neben seiner Fähigkeit zur Induktion der Genexpression, ist PPAR γ in der Lage, über die direkte Interaktion mit anderen Proteinen, in verschiedene Signalwege einzugreifen [33]. Diese Fähigkeit wird als Transrepression bezeichnet, über die PPAR γ die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege verhindert und somit eine anti-inflammatorische Immunantwort hervorruft. Bisher wurden fünf mögliche Transrepressions-Mechanismen identifiziert, die im Folgenden näher erläutert werden sollen (Abb. 4).

(1) PPAR γ kann Coaktivatoren, wie SRC-1 und CBP/p300 binden (1.2.2), welche auch essentiell für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren sind. Nach der Aktivierung von PPAR γ stehen diese Coaktivatoren unter anderem dem pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B (,nuclear factor κ B') nicht mehr zur Verfügung, wodurch dessen Fähigkeit zur Induktion pro-inflammatorischer Gene vermindert ist (Abb. 4, A) [34, 35]. (2) Weiterhin ist PPAR γ in der Lage direkt an andere Transkriptionsfaktoren zu binden, wodurch diese an der Assoziation mit ihrem entsprechenden Responsive Element im Promotorbereich gehindert werden. Damit wird auch die Genexpression regulierter Zielgene des entsprechenden Transkriptionsfaktors inhibiert (Abb. 4, B). Dieser Mechanismus wird als ,cross coupling' oder ,mutual receptor antagonism' bezeichnet. Bekannteste Beispiele hierfür sind die Hemmung der NF- κ B-, NFAT (,nuclear factor of activated T cell')-, AP-1(,activated protein-1')- und STAT (,signal transducers and activator of transcription')-vermittelten Genexpression [36]. (3) Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist die PPAR γ -vermittelte Hemmung der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), welche allerdings auf noch nicht geklärten Signalwegen erfolgt. Durch die Hemmung der MAPK können entsprechende

MAPK-abhängige Transkriptionsfaktoren nicht mehr aktiviert werden. Dies kann ebenfalls zur Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Gene führen (Abb. 4, C) [37].

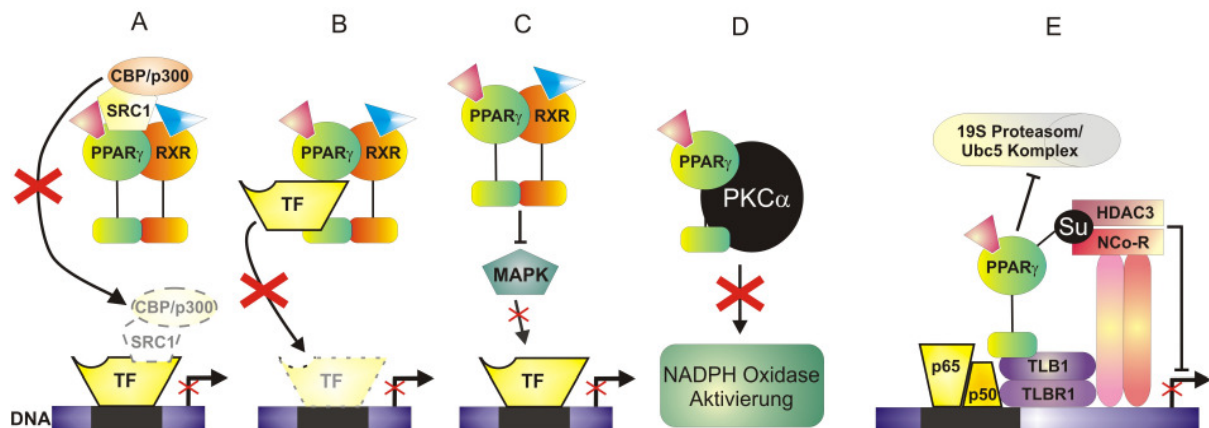


Abb. 4: Die PPAR γ -abhängige Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression. Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, über die PPAR γ die Genexpression verschiedener Proteine induziert, ist es in der Lage mit dessen Fähigkeit zur Transrepression regulierend in vor allem pro-inflammatorische Signalwege einzugreifen. Bisher wurden fünf Transrepressions-Mechanismen in Immunzellen beschrieben: (A) PPAR γ bindet Coaktivatoren wie SRC-1 und CBP/p300, welche somit einem anderen Transkriptionsfaktor (TF) nicht mehr zur Verfügung stehen. (B) Weiterhin kann PPAR γ direkt an andere TFs binden (z. B. NF- κ B, NFAT, AP-1, STAT) und diese wiederum an deren Bindung im Promotor pro-inflammatorischer Zielgene zu hindern. Dieser Mechanismus wird auch als ‚cross coupling‘ bzw. ‚mutual receptor antagonism‘ bezeichnet. (C) Auf bisher noch unbekanntem Wege kann PPAR γ die Aktivierung der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) hemmen. Dies hat die Inhibition MAPK-abhängiger TFs und somit deren Genexpressions-Induktion zur Folge. (D) Neben der direkten Bindung von PPAR γ an Transkriptionsfaktoren wurde auch dessen Assoziation mit der PKC α (Protein-Kinase C α) beschrieben, wodurch deren Translokalisierung zur Membran und damit auch die Phosphorylierung von Zielproteinen, wie z. B. die NADPH-Oxidase, verhindert wird. (E) Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Sumoylierung von PPAR γ durch SUMO („small ubiquitin-like modifier“) zu dessen Bindung an den NcoR(nuclear receptor co-repressor‘)-HDAC3(histone deacetylase-3‘)-TBL1(transducin beta-like protein 1‘)-TBLR1 complex‘ führt und damit den Zugriff des Proteasoms auf diesen Repressorkomplex verhindert. Dadurch erfolgt die Transrepression der NF- κ B-vermittelten, pro-inflammatorischen Genexpression.

Neuere Studien weisen auf zwei weitere Mechanismen hin. (4) Zum einen wurde gezeigt, dass PPAR γ auch ohne Ausbildung eines Heterodimers mit RXR in der Lage ist an PKC α (Protein-Kinase C α) zu binden und diese an der Translokalisierung, die essentiell für ihre Aktivierung ist, zu hindern (Abb. 4, D). Die Hemmung der PKC α -Translokalisierung führt beispielsweise in Makrophagen dazu, dass die Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit der ‚oxidative burst‘, d. h. die Produktion antimikrobieller ROS, inhibiert wird [38, 39]. (5) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine PPAR γ -Modifikation durch SUMO

(,small ubiquitin-like modifier') dazu führt, dass dieses an den ,NcoR(,nuclear receptor co-repressor')-HDAC3(,histone deacetylase-3')- TBL1(,transducin beta-like protein 1')-TBLR1 complex' bindet und so den proteasomalen Abbau dieses Repressorkomplexes verhindert. Dadurch wird die NF- κ B-vermittelte, pro-inflammatorische Genexpression, wie z.B. des iNOS-Gens, transreprimiert (Abb. 4, E) [40].

Aufgrund der nun dargestellten Funktion von PPAR γ als Transkriptionsfaktor und seiner Fähigkeit zur Hemmung pro-inflammatorischer Mediatoren durch Transrepression, hat das Protein PPAR γ vielfältige Möglichkeiten in verschiedene Signalkaskaden regulierend einzugreifen. Grundvoraussetzung für diese Fähigkeiten ist allerdings die Bindung von spezifischen PPAR γ -Liganden, wobei zwischen natürlichen, d. h. physiologisch vorkommenden und synthetischen Liganden unterschieden wird. Für sehr viele *in vitro* aber auch *in vivo* Studien werden häufig synthetische Liganden vor allem Substanzen aus der Gruppe der Thiazolidindione (TZDs) verwendet. Viele Studien weisen allerdings auch darauf hin, dass zahlreiche Effekte der verwendeten Liganden, welche auch als PPAR γ -Agonisten bezeichnet werden, auf PPAR γ -unabhängige Signalwege zurückzuführen sind. Daher beschäftigt sich das folgende Kapitel eingehend mit diesen Liganden.

1.2.4 PPAR γ -Liganden

Da die PPAR-Isoformen α , β/δ und γ strukturell weitestgehend homolog sind, ist es nicht verwunderlich, dass deren Liganden ebenfalls vergleichbare Strukturen besitzen. So ist die aktivierende Wirkung eines Liganden meist nicht auf einen PPAR-Subtyp beschränkt. Natürliche Liganden der PPARs sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, sowie Eicosanoide und Prostaglandine [41, 42]. So können beispielsweise die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure alle drei PPAR-Isoformen binden, jeweils mit EC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich. Es wurden jedoch sowohl natürliche als auch synthetische PPAR-Liganden identifiziert, die selektiv nur eine Isoform der PPARs binden. Diese Arbeit befasst sich mit PPAR γ und dessen Liganden, weshalb die selektiven PPAR γ -Liganden im Folgenden näher dargestellt werden.

1.2.4.1 Natürliche PPAR γ -Liganden

Da PPAR γ ein Regulator des Lipid-Stoffwechsels ist, liegt es nahe, dass Fettsäuren natürliche PPAR γ -Liganden darstellen. Interessanter sind aber die zu den Eicosanoiden zugehörigen 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, ein Prostaglandin-Derivat, sowie 9-HODE, 13-HODE und 8(S)-HETE,

als selektive natürliche Liganden von PPAR γ (Abb. 5) [41-44], da diese vor allem im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle spielen. Sie entstehen bei der Metabolisierung der Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) durch die Lipoxygenase oder bei der Metabolisierung zu Prostaglandinen durch die Cyclooxygenasen (COX). Darüber hinaus konnte in Monozyten bzw. Makrophagen nachgewiesen werden, dass oxLDL, welches die bereits erwähnten Komponenten 9-HODE und 13-HODE enthält, PPAR γ aktiviert, und somit eine wichtige Rolle bei der Schaumzellendifferenzierung bzw. der Pathogenese der Atherosklerose spielt [45]. Ebenfalls in Monozyten/Makrophagen konnte NO („nitric oxide“) als PPAR γ -Aktivator identifiziert werden [46], wobei jedoch noch unklar ist, ob NO PPAR γ direkt oder indirekt, über die Induktion einer Signalkaskade, aus der ein Ligand resultiert, aktiviert.

Vor allem die Identifikation von Fettsäurederivaten als selektive PPAR γ -Liganden, die infolge von inflammatorischen Prozessen entstehen, bestätigte, neben seinen Funktionen im Glukose- und Lipid-Stoffwechsel, die enorme Bedeutung von PPAR γ als potentieller Regulator der Immunantwort.

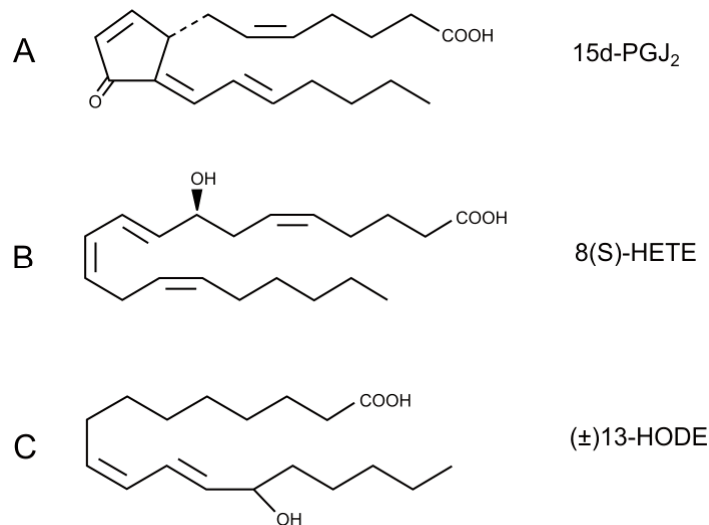


Abb. 5: Strukturformeln ausgewählter natürlicher Liganden von PPAR γ . Zu den natürlichen Liganden zählen Verbindungen aus der Klasse der Eicosanoide, die beim Entzündungsgeschehen eine elementare Rolle spielen. Exemplarisch sind die Strukturformeln der Eicosanoide (A) 15d-PGJ₂ (B) 8(S)-HETE und (C) (±)13-HODE angegeben.

1.2.4.2 Synthetische PPAR γ Liganden

Die bekanntesten synthetischen PPAR γ -Liganden sind die Thiazolidindione (TZDs), welche auch als Glitazone bezeichnet werden. Sie wurden Mitte der 80er Jahre als potentielle Therapeutika gegen Diabetes mellitus Typ-2 identifiziert, bei dem es zu einem stark erhöhten Blutglukosespiegel kommt, da der Kohlenhydrat- und Lipid-Metabolismus aufgrund einer

Insulinresistenz gestört ist. Patienten mit Diabetes mellitus Typ-2, denen TZDs oral verabreicht wurden, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin. Dies trug den TZDs den Beinamen ‚Insulinsensitizer‘ ein. Es zeigte sich auch eine verbesserte Funktion der Beta-Zellen. Zusätzlich zur antidiabetischen Wirkung der TZDs konnte ihnen, basierend auf Tiermodellen, auch eine hyperlipidämische Wirkung zugeordnet werden, weshalb diese Substanzklasse auch für die Behandlung der Dyslipidämie in Frage kommen könnte [47-50]. Der genaue Wirkmechanismus der TZDs war allerdings unbekannt, bis Lehmann et al. Mitte der 90er Jahre nachweisen konnten, dass die TZDs hoch affine selektive PPAR γ -Liganden darstellen [51]. Somit führt die Aktivierung von PPAR γ durch TZDs, vor allem im Fettgewebe, zur Regulation von Genen, die die Insulinsensitivität maßgeblich beeinflussen, wie z. B. Leptin, Adiponectin, Resistin, PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), IL-6 und TNF α [48, 52].

Alle TZDs, wie z. B. die in dieser Arbeit verwendeten Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon (Abb. 6A), weisen das charakteristische 2,4-Thiazolidindion-Strukturmotiv auf (Abb. 6B). Dabei kann man prinzipiell drei strukturelle Teile unterscheiden: eine azide Kopfgruppe (Thiazolidindion-Kopfgruppe [blau]), ein zentraler Aryl-Spacer [rot] und ein lipophiler Rest [gelb]. Diese Struktur erinnert zumindest teilweise an den Aufbau von Fettsäurederivaten, die wie bereits erwähnt zu den natürlichen Liganden von PPAR γ zählen (1.2.4.1). In zahlreichen Studien wurden bereits vorhandene TZDs chemisch modifiziert, um die Selektivität und Affinität zu PPAR γ weiter zu erhöhen. Hierbei zeigte sich, dass die Einführung eines heterozyklischen Stickstoff(N)-Atoms im Bereich des lipophilen Teils [gelb], wie z. B. bei Rosiglitazon zu erkennen ist (Abb. 6A), zu einer starken Erhöhung der Affinität führte [53]. Dies liegt vermutlich daran, dass das nun vorhandene N-Atom eine Wasserstoff-Brückenbildung mit einer in der PPAR γ -LBD befindlichen Aminosäure ausbilden kann, und somit die Bindung begünstigt. Beim therapeutischen Einsatz von Glitazonen, wie den derzeitig verwendeten Pioglitazon und Rosiglitazon, traten einige unerwünschte Nebenwirkungen auf (1.2.4.3), die auf die komplette Klasse der TZDs zurückzuführen waren. Um diese Nebenwirkungen zu minimieren wurden weitere synthetische Verbindungen mit hoher Affinität und Selektivität zu PPAR γ entwickelt, die nicht das Thiazolidindion-Strukturmotiv aufwiesen.

Diese synthetischen PPAR γ -Liganden werden als Nicht-TZD-Typen bezeichnet. Hierzu zählen u. a. Metaglidasen (Metabolex), FMOC-Leu, nTZDpa, SPPARM12 und T131 (Amgen (Tularik)). Einige dieser neuen Liganden befinden sich in Phase II bzw. III klinischer Studien, nachdem in Tiermodellen zur Untersuchung von Diabetes mellitus Typ-2 ihre

antidiabetische Wirkung bestätigt werden konnte, ohne dass TZD-hervorgerufene Nebenwirkungen auftraten [52]. Somit könnten PPAR γ -Liganden aus der Gruppe der Nicht-TZD-Typen neue potentielle Therapeutika als Ersatz für die bisher verwendeten TZDs darstellen.

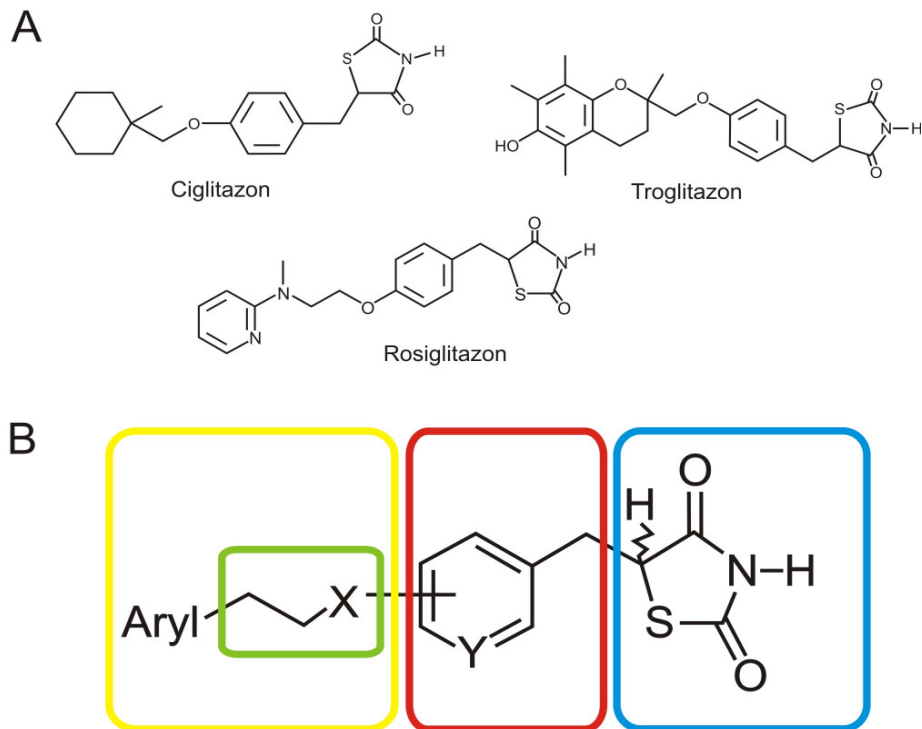


Abb. 6: Die chemische Struktur der TZDs. (A) Exemplarisch sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Thiazolidindione Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon dargestellt. (B) Der allgemeine Aufbau der TZDs zeichnet sich durch eine azide Thiazolidindion-Kopfgruppe (blau) sowie einen zentralen Aryl-Spacer (rot), der über einen Linker (grün) an einen lipophilen Rest (gelb) gebunden ist, aus.

1.2.4.3 Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione

Zu den Nebenwirkungen, die bei der TZD-basierten Therapie bei Diabetes mellitus Typ-2 auftreten, zählen Körpergewichtszunahme, Erniedrigung des Hämatokrits und des Hämoglobingehaltes, periphere Ödeme und ein erhöhtes Risiko zur kongestiven Herzinsuffizienz [52]. Bei einigen TZDs konnten neben diesen Gruppen-spezifischen Nebenwirkungen noch individuelle Effekte nachgewiesen werden, die auf die TZD-Verbindung per se zurückzuführen waren. Das bekannteste Beispiel hierzu ist die Lebertoxische Wirkung von Troglitazon, welche beim derzeit verwendeten TZD Rosiglitazon nicht auftritt [54, 55]. Aufgrund der Lebertoxizität wurden die klinischen Studien mit Troglitazon als antidiabetisches Medikament im Jahr 2000 abgebrochen [56].

Durch den therapeutischen Einsatz der TZDs als selektive PPAR γ -Liganden, kommt es zur PPAR γ -Aktivierung in unterschiedlichen Geweben. Dies hat verschiedene physiologische Konsequenzen zur Folge, auf die viele Nebenwirkungen TZD-basierter Therapien zurückzuführen sind [52]. Jedoch konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die TZDs auch unabhängig von der PPAR γ -Aktivierung in diverse Signalwege eingreifen können. Dies wird dadurch begründet, dass die Effekte auch ohne PPAR γ -Expression auftreten und die verwendeten Konzentrationen weit höher liegen als die jeweiligen EC₅₀-Werte. Zudem zeigten bekannte PPAR γ -Antagonisten, welche die PPAR γ -Aktivierung hemmen, keine inhibitorische Wirkung auf die TZD-induzierten Effekte [57]. Aktuelle Studien, die sich mit den PPAR γ -unabhängigen Effekten der TZDs befassen, deuten auf das Mitochondrium als primäres Ziel hin. Vor allem bei den TZDs Troglitazon und Ciglitazon konnte eine sehr schnelle Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) nachgewiesen werden. In der Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 führte Troglitazon zu einer schnellen Zelltod-Induktion, welche vor allem auf eine Mitochondrien-Dysfunktion, sowie eine erhöhte Zellpermeabilität, vermehrten Calcium-Einstrom und Caspase-3-Aktivierung zurückgeführt werden konnte [58, 59]. Hierbei ist zu beachten, dass die verwendeten Konzentrationen an Troglitazon um mehr als das zehnfache höher waren als dessen EC₅₀-Wert von 0,78 μ M [57]. Es liegt daher nahe, dass die beobachteten Effekte größtenteils unabhängig von einer PPAR γ -Aktivierung sind. Ähnliche PPAR γ -unabhängige Effekte konnten auch bei Ciglitazon identifiziert werden, wobei auch hier die verwendeten Konzentrationen um ein fünf- bis zehnfaches über dessen EC₅₀-Wert von 3 μ M lagen [57]. So zeigte sich, dass Ciglitazon in der Leukämie-Zelllinie HL-60 und in Astrozyten einen schnellen Zusammenbruch des $\Delta\Psi_M$ bewirkte, welcher mit einer massiven Produktion von ROS und Laktat einherging [57, 60, 61]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TZDs direkt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette inhibieren können [61, 62]. Dies unterstützt die Annahme, dass Effekte der TZDs auf das Mitochondrium für mögliche Nebeneffekte der TZD-Therapie mitverantwortlich sein könnten.

Somit können TZDs bei Konzentrationen weit über ihren EC₅₀-Werten, neben ihrer PPAR γ -Aktivierung auch direkt auf die mitochondriale Atmungskette wirken und damit den glykolytischen Metabolismus beeinflussen.

Neue Erkenntnisse von TZD-induzierten PPAR γ -abhängigen und -unabhängigen Effekten sind von großer Bedeutung, da TZDs neben ihrem derzeitigen Einsatz als antidiabetische Medikamente auch als potentielle Therapeutika zur Behandlung von Krebs sowie inflammatorischer und neurodegenerativer Krankheiten angesehen werden [63].

1.2.5 Die Bedeutung von PPAR γ in T-Zellen

1.2.5.1 PPAR γ -Expression in T-Zellen

T-Zellen, als Teil des adaptiven Immunsystems, sind hauptsächlich für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, indem sie über die Ausschüttung verschiedener Cytokine die Reaktionen von z. B. Makrophagen, B-Zellen und anderen Immunzellen modulieren. Vor allem beim „Wieder-Erkennen“ von Antigenen, denen das Immunsystem früher bereits ausgesetzt war, steuern T-Zellen die Immunantwort in dem Maß, so dass eine überschießende Reaktion vermieden wird, aber dabei das Antigen trotzdem effizient bekämpft wird. Mit der Entdeckung, dass PPAR γ einen potentiellen Regulator inflammatorischer Prozesse darstellt (1.2.3), rückte das Interesse für die Rolle dieses Faktors in den Vordergrund zahlreicher Studien. Tatsächlich konnte die Expression der PPAR γ -mRNA und des PPAR γ 1-Proteins sowohl in murinen als auch in humanen T-Zellen nachgewiesen werden [26, 64-68]. Hierbei ist interessant, dass in ruhenden murinen als auch in humanen T-Zellen eine moderate Expression vorlag, welche jedoch durch Mitogen-vermittelte Aktivierung der T-Zellen deutlich gesteigert werden konnte [26, 67]. Die genauen Signalwege, die zur Steigerung der PPAR γ -mRNA-Expression führen sind allerdings noch unbekannt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass transformierte T-Zelllinien, wie z. B. Jurkat und CCRF-CEM auch im ruhenden Zustand eine erhöhte PPAR γ -Expression aufweisen [28, 66]. Aufgrund der vorliegenden basalen PPAR γ 1-Expression und besonders der gesteigerten Expression während der T-Zell-Aktivierung, kommt PPAR γ als potentieller Regulator in T-Zellen während der Immunantwort in Frage.

1.2.5.2 Die anti-inflammatorische bzw. anti-proliferative Wirkung von PPAR γ in T-Zellen

Eine Liganden-induzierte PPAR γ -Aktivierung kann in T-Zellen zur Hemmung der Proliferation als auch des T-Zell-Aktivierungs-Prozesses führen [24, 68-70] (Abb. 7). Bei beiden Vorgängen ist die Produktion von IL-2, IL-4 und IFN γ von besonderer Bedeutung. Die Expression dieser Faktoren wird vor allem über Signalwege reguliert, in denen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NFAT und AP-1 involviert sind [71]. Hierbei ist zu beachten, dass AP-1 ein Sammelbegriff für eine ganze Gruppe von Transkriptionsfaktoren ist, die sich aus den Untereinheiten Jun, Fos oder dem aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF) zusammensetzen. Die AP-1-Faktoren sind wichtige Regulatoren der Zellproliferation sowie

der Zellvitalität [72]. In T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression durch die erwähnten Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NFAT und AP-1 über die in 1.2.3 beschriebenen Mechanismen der PPAR γ -vermittelten Transrepression inhibiert werden kann. So führt z. B. die Aktivierung von PPAR γ in CD4⁺ T-Zellen zur Hemmung der IL-4 Produktion aufgrund der Bindung von PPAR γ an NFAT [73]. Ein weiteres Beispiel ist die Inhibition der CD3/CD28-vermittelten Proliferation und Cytokin-Sekretion in murinen T-Zellen. Hier erfolgte durch die simultane Gabe von Ciglitazon als PPAR γ -Ligand und der Antikörperkombination α -CD3/ α -CD28 zur T-Zell-Aktivierung, die PPAR γ -vermittelte Hemmung der NF- κ B- und AP-1-Aktivierung [24]. Diese Studien belegen die Rolle von PPAR γ als Vermittler einer anti-inflammatorischen Antwort in T-Zellen.

1.2.5.3 Die pro-apoptotische Funktion von PPAR γ in T-Zellen

Neben der in 1.2.5.2 beschriebenen anti-inflammatorischen bzw. anti-proliferativen Funktion von PPAR γ wurde auch die Induktion der Apoptose in Lymphozyten generell und speziell in T-Zellen anhand klassischer Apoptose-Messungen wie Caspase-Aktivierung und Annexin V-FITC/PI-Färbung, nach der PPAR γ -Aktivierung gezeigt [26, 65, 66, 74-77]. Offensichtlich spielt bei der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-Zellen die zeitliche Abfolge der Stimulation, d. h. ob die PPAR γ -Aktivierung während oder nach der T-Zell-Aktivierung erfolgt, eine entscheidende Rolle (Abb. 7). Die Inkubation von ruhenden humanen T-Zellen mit den TZDs Ciglitazon, Troglitazon, Rosiglitazon sowie Pioglitazon führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Zelltodrate [26, 75]. Auch die gleichzeitige Inkubation der T-Zellen mit PPAR γ -Liganden und T-Zell-aktivierenden Substanzen wie PHA bzw. TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat)/Ionomycin führte nicht zur Apoptose-Induktion, wohl aber zur Hemmung der Proliferation (siehe 1.2.5.2) [26, 75]. Anders verhält es sich, wenn man die T-Zellen zuerst mit beschriebenen Mitogenen aktiviert, wie z. B. PHA, und dann mit PPAR γ -Liganden inkubiert. Bei diesem Ansatz konnte eine Induktion der Apoptose festgestellt werden [26], da durch die Aktivierung der T-Zellen die PPAR γ -Expression deutlich verstärkt wird [26, 67] und somit PPAR γ eventuell erst apoptotisch wirken kann. Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, dass transformierte T-Zelllinien, wie z. B. Jurkat, CCRF-CEM, J-Jahn, sowie andere Leukämie-Zelllinien, wie z. B. HL-60 Zellen, eine basal höhere PPAR γ -Expression aufweisen und somit auch ohne Vorstimulation sensitiver gegenüber der Apoptose-Induktion durch PPAR γ -Liganden reagieren [26, 66, 76, 77].

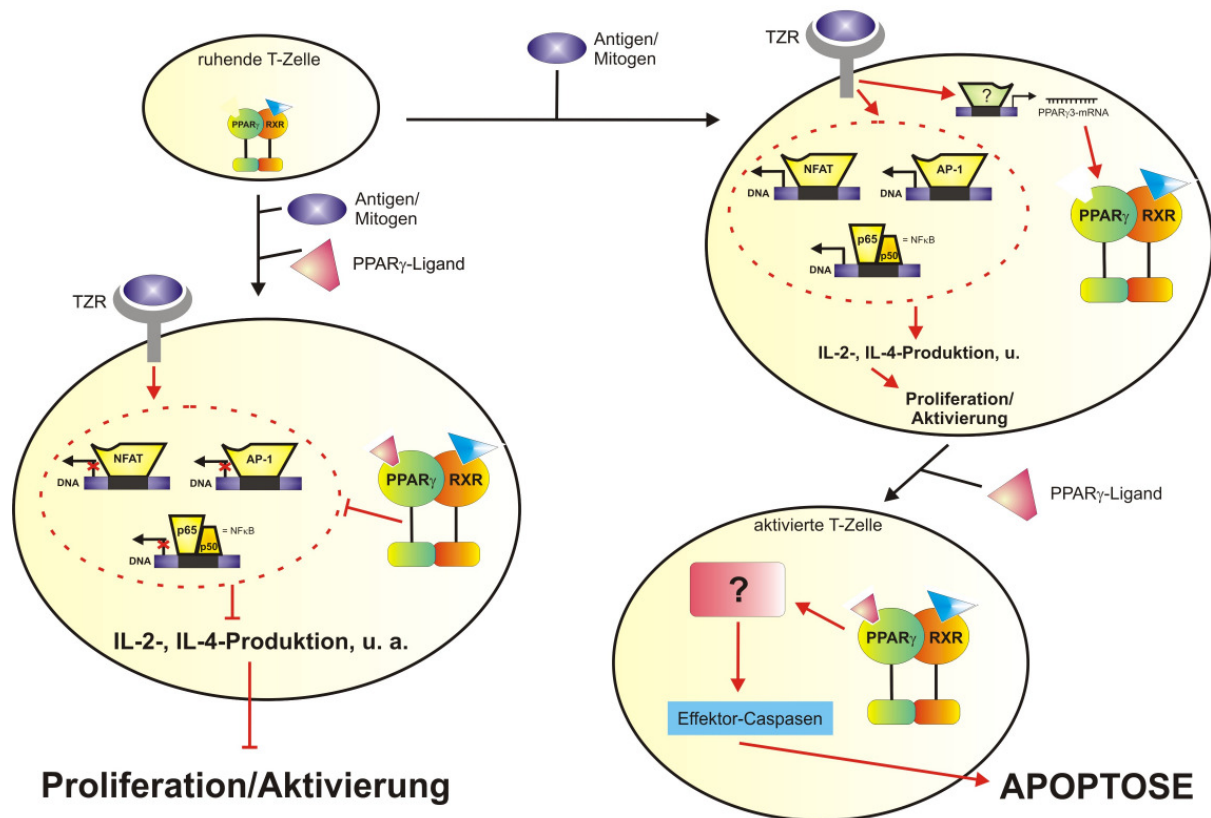


Abb. 7: Auswirkungen der PPAR γ -Aktivierung in T-Zellen. In ruhenden T-Zellen liegt eine moderate PPAR γ -Expression vor. Kommt es zur simultanen Stimulation der T-Zellen mit einem Antigen/Mitogen und einem PPAR γ -Liganden (linke Seite der Abbildung), wird die T-Zell-Rezeptor (TZR)-vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (TFs) wie z. B. NFAT, NF- κ B, und AP-1 durch Transrepressions-Mechanismen infolge der PPAR γ -Aktivierung durch dessen Liganden, inhibiert. Hierdurch wird die Sekretion von z. B. IL-2, IL-4 inhibiert und es kommt zur Hemmung des T-Zell-Aktivierungsprozesses und der T-Zell-Proliferation. Durch alleinige Antigen/Mitogen-Stimulation (rechte Seite der Abbildung), kommt es zur verstärkten Expression der PPAR γ 3-mRNA, sowie zur Aktivierung der TFs NFAT, NF- κ B, und AP-1 und damit zur T-Zell-Aktivierung und Proliferation. Die Inkubation solcher aktivierten T-Zellen mit PPAR γ -Liganden führt PPAR γ -vermittelt, jedoch auf noch ungeklärten Signalwegen zur Apoptose.

Der natürliche PPAR γ -Ligand 15d-PGJ₂ kann sowohl in aktivierten als auch in ruhenden T-Zellen den Zelltod auslösen. Dies deutet darauf hin, dass dieser Ligand auch PPAR γ -unabhängige Effekte vermittelt [28, 66, 75]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass 15d-PGJ₂ auch ohne Beteiligung von PPAR γ direkt die IKK (inhibitorische- κ B-Kinase)-Aktivität und damit NF- κ B-vermittelte Signalwege inhibieren kann [78]. Wie in Abschnitt 1.2.4.3 bereits beschrieben, können auch die PPAR γ -Liganden aus der Gruppe der TZDs auf PPAR γ -unabhängigen Wegen zum Tod der Zellen führen. Dies hängt allerdings stark von der verwendeten Konzentration ab. Somit müssen auch diese TZD-Effekte in den Studien, die

sich mit der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-Zellen befassen, berücksichtigt werden. Es konnte jedoch, unter Verwendung von PPAR γ -Antagonisten, wie z. B. GW9662 oder BADGE, die pro-apoptotische Funktion von PPAR γ in Lymphozyten bestätigt werden [25, 28].

Die Signalwege, über die PPAR γ Apoptose in den Lymphozyten induziert, sind zum Großteil noch nicht aufgeklärt. Zumindest kommt es zur Aktivierung der Caspase-9 und -3 sowie zur PARP-Spaltung [25, 28, 77]. In HL-60 Zellen wird postuliert, dass die PPAR γ -Aktivierung zur verminderten Expression des Proto-Onkogens *c-myc* führt [77], von dem bekannt ist, dass es an der Regulation der Apoptose beteiligt ist [79]. Studien zur PPAR γ -vermittelten Apoptose in Lungenkarzinomzellen und osteoblastischen Zellen weisen auf eine mögliche Beteiligung des MAPK/ERK-Signalweges, sowie die Produktion von ROS hin [80-83]. Dahingegen deuten Studien in Brustkarzinomzellen auf eine mögliche Rolle des PTEN/Akt-Signalweges hin [84]. Noch ist allerdings unbekannt, in wie weit die genannten Signalwege auch in die PPAR γ -vermittelte Apoptose-Induktion in Lymphozyten, und besonders in T-Zellen, involviert sind.

PPAR γ kann somit in T-Zellen, abhängig von den physiologischen Bedingungen, die oben beschriebenen anti-inflammatorischen, anti-proliferativen aber auch pro-apoptotischen Wirkungen hervorrufen. Eine Erkrankung, bei der die Regulation dieser genannten Effekte u. a. in T-Zellen außer Kontrolle gerät, ist die Sepsis.

1.3 Sepsis

1.3.1 Bedeutung der Sepsis

Sepsis ist die am häufigsten auftretende Krankheit auf Intensiv-Stationen. Obwohl sich die medizinischen Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten wesentlich verbessert haben, stieg die Zahl an Patienten mit einer Sepsis bzw. einem septischen Schock an. Jährlich erkranken ca. 3 von 1000 Patienten in Europa an einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock, mit ~135000 Todesfällen pro Jahr [36, 85, 86].

Somit ist die Sepsis immer noch ein intensivmedizinisches Problem. Dies ist damit begründet, dass die Ursachen sehr unterschiedlich sein können und die pathophysiologischen Zusammenhänge sehr komplex, und zudem noch recht wenig verstanden sind. Aufgrund des multifaktoriellen klinischen Verlaufs stellt die klare Definition der Sepsis bereits ein Problem dar.

1.3.2 Definition der Sepsis

Eine erste klare Definition der Sepsis lieferten 1989 Bone et al. [87], welche dann 1991 durch eine Konsensus-Konferenz der Fachgesellschaften ‚American College of Chest Physicians‘ und ‚Society of Critical Care Medicine‘, bestätigt wurde [88]. Die Sepsis ist definiert als ein systemisches inflammatorisches Reaktions-Syndrom (SIRS), welches infolge einer nachgewiesenen Infektion auftritt. Dabei wird SIRS als eine generelle hyperinflammatorische Reaktion definiert, die durch unterschiedliche Ursachen wie z. B. Infektion, Trauma oder Verbrennung hervorgerufen wird [89]. SIRS ist diagnostiziert, wenn mindestens zwei oder mehr der folgenden Symptome auftreten:

- (a) Fieber: Körpertemperatur $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie: Körpertemperatur $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder -vesikale Messung
- (b) Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 Schläge/min
- (c) Tachypnoe: Frequenz ≥ 20 Atemzüge/min oder Hyperventilation: $\text{PaCO}_2 \leq 33$ mmHg
- (d) Leukozytose: Zellzahl ≥ 12000 Zellen/ mm^3 oder Leukozytopenie: Zellzahl ≤ 4000 Zellen/ mm^3 oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild

Von einer schweren Sepsis spricht man, wenn zu den genannten Kriterien noch eine akute Organ-Dysfunktion vorliegt. Kommt zu den Symptomen, trotz adäquater Volumensubstitution eine Hypotonie hinzu, spricht man vom septischen Schock. Die Mortalitätsrate bei Patienten mit einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock liegt bei über 50% [90].

1.3.3 Die Pathophysiologie der Sepsis

Ursache einer Sepsis ist die Invasion von Erregern oder deren Toxinen in den Blutkreislauf, worauf das Immunsystem in nicht adäquater Weise reagiert bzw. sogar völlig versagt (Abb. 8). Natürlich spielt hierbei die Anzahl, Art und Virulenz der Erreger, sowie der gegenwärtige Zustand des Immunsystems, und die Intensität der Reaktion des Wirtsorganismus auf den Erreger eine entscheidende Rolle. Am häufigsten gehen Lungenentzündungen, sowie Bakteriämien und Infektionen der Harnwege und Geschlechtsorgane einer Sepsis voraus [91]. Bei den Sepsis-auslösenden Erregern handelt es sich in den meisten Fällen um Bakterien, doch können auch Erreger fungaler, viraler oder parasitärer Natur die Ursache darstellen [85, 90, 92, 93]. Durch den Kontakt von immunkompetenten Zellen mit den Pathogenen kommt es in der so genannten hyper-inflammatorischen Phase zu einer starken Aktivierung vor allem

von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen, welche als Reaktion vermehrt pro-inflammatorische Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ freisetzen [93, 94]. Diese primäre Immunantwort wird durch das Freisetzen sekundärer Mediatoren, wie z. B. ROS verstärkt. Infolge dieser komplexen Kaskade wird auch das Koagulationssystem aktiviert, wodurch es zur Bildung von Mikrothromben in den Kapillaren und damit zu einem Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) kommen kann [95]. Im weiteren Verlauf der Sepsis kommt es in der so genannten hypo-inflammatorischen Phase zur vermehrten Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren wie z. B. des löslichen $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptors, $\text{IL-1}\beta$ Rezeptorantagonisten sowie IL-4 und IL-10 . Zusammen mit der ebenfalls auftretenden verstärkten Apoptoserate immunkompetenter Zellen (Leukozytopenie) kommt es dann zu einem kompensatorischen anti-inflammatorischen Reaktions-Syndrom (CARS ‚compensatory anti-inflammatory response syndrome‘). Die dadurch stark supprimierte Immunantwort wird auch als Immunparalyse bezeichnet [96, 97], und lässt keine adäquate Immunreaktion gegenüber der nicht erfolgreich bekämpften Primärinfektion oder einer auftretenden Sekundärinfektion zu. CARS in Kombination mit MODS und septischem Schock ist hauptsächlich für die hohe Mortalitätsrate bei der Sepsis verantwortlich.

In Studien von Hotchkiss et al. zeigte sich, dass die oben erwähnte Apoptose der immunkompetenten Zellen (Leukozytopenie) in der hypo-inflammatorischen Phase eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Sepsis einnimmt. Bei Patienten, die an einer Sepsis verstarben, konnten sehr hohe Apoptoseraten der Lymphozyten gemessen werden, wobei der Grad der Lymphozyten-Apoptose mit der Schwere der Sepsis korrelierte [98, 99]. Die Leukozytopenie beruht somit auf der erhöhten Apoptose der Lymphozyten (Lymphopenie), welche hauptsächlich auf die Depletion von CD4^+ T-Zellen und B-Zellen zurückzuführen war [100, 101]. Aufgrund dieser Lymphopenie ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage adäquat auf einen Erreger zu reagieren, weshalb die Hemmung der Depletion der Lymphozyten, wie z. B. der CD4^+ T-Zellen, einen potentiellen Therapie-Ansatz darstellt. Studien im Tiermodell zeigen, dass die Inhibition der Sepsis-induzierten Lymphozyten-Apoptose, z. B. durch Bcl-2-Überexpression, Hemmung des Fas-Rezeptors sowie Hemmung der Caspasen, zur Erhöhung der Überlebensrate der Tiere führte [96].

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Apoptose der Lymphozyten während der Sepsis sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Apoptose-Signalweg erfolgen kann [96]. Die genauen Signalwege, die die Apoptose induzieren, sind allerdings noch weitestgehend unbekannt, deren Aufklärung jedoch in Anbetracht eines potentiellen Therapie-Einsatzes unumgänglich. Im Verlauf der Sepsis ist eine Aktivierung der T-Zellen zu

erwarten, welche diese gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose sensitiviert (siehe 1.2.5.3). Zudem könnten potentielle PPAR γ -Liganden, aufgrund der inflammatorischen Immunantwort (1.2.4.1) während der Sepsis, vorliegen. Somit ist auch eine mögliche Rolle von PPAR γ bei der auftretenden Lymphopenie denkbar.

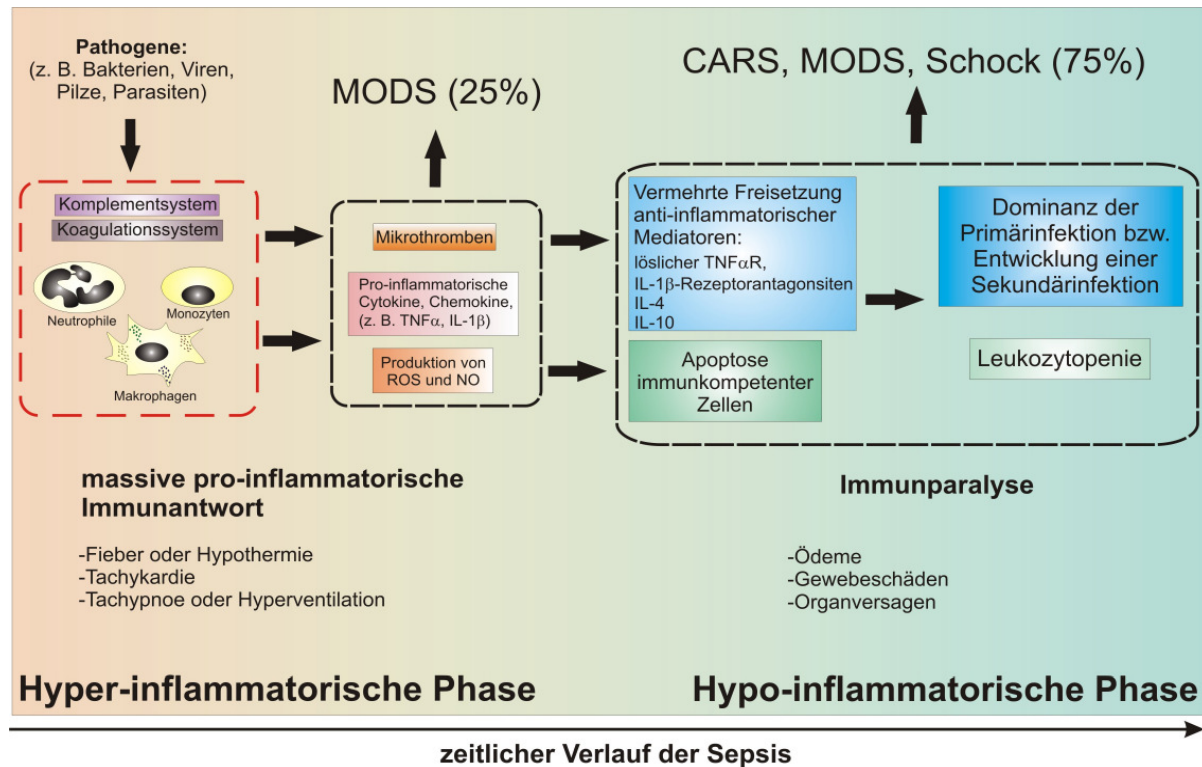


Abb. 8: Die Pathogenese der Sepsis. Die Sepsis wird hauptsächlich durch in den Blutkreislauf eindringende Bakterien verursacht, allerdings kommen auch Pathogene wie Viren, Pilze oder Parasiten in Frage. Durch den Kontakt mit Immunzellen, vor allem Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen kommt es zu einer komplexen Signalkaskade, in deren Folge u. a. das Komplementsystem, sowie das Koagulationssystem aktiviert werden. Es kommt zu einer massiven pro-inflammatorischen Immunantwort, indem verstärkt verschiedene pro-inflammatorische Faktoren, wie z. B. TNF α , IL-1 β sowie ROS und NO sekretiert werden. In dieser hyper-inflammatorischen Phase treten klinische Symptome wie Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, sowie Tachypnoe oder Hyperventilation auf, die für die Sepsis-Definition herangezogen werden. Durch die Aktivierung des Koagulationssystems kann es zur Bildung von Mikrothromben kommen, die die Versorgung der Organe massiv stören und somit zu einem Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) führen können. Dies kommt in 25% aller Fälle vor. Der größere Anteil der Patienten (75%) gelangt in die hypo-inflammatorische Phase, die durch vermehrte Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren wie z. B. löslicher TNF α R, IL-1 β -Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10 und durch apoptotische Depletion von Immunzellen (Leukozytopenie) verursacht wird. Es kann ein kompensatorisches anti-inflammatorisches Reaktions-Syndrom (CARS) auftreten, bei dem das Immunsystem derart stark supprimiert ist (Immunparalyse), dass die nicht erfolgreich bekämpfte Primärinfektion wieder dominiert, bzw. es zu einer Sekundärinfektion kommen kann. Zusammen mit in dieser Phase auftretenden Ödemen, Geweschäden und Organversagen führen CARS und MODS, häufig im septischen Schock, zum Tod des Patienten.

1.3.4 Die Rolle von PPAR γ bei der Pathogenese der Sepsis

Da PPAR γ , wie bereits beschrieben, als anti-inflammatorischer (1.2.3) aber auch als proapoptotischer Faktor (1.2.5.3) identifiziert wurde, wird eine potentielle Rolle von PPAR γ in der Pathogenese der Sepsis postuliert. Mehrere Studien haben sich mit dem möglichen Einfluss der PPAR γ -Aktivierung auf den Verlauf einer Sepsis im Tiermodell beschäftigt. So konnten Collin und Thiemermann in einem Ratten-Sepsis-Modell nachweisen, dass die externe Zugabe des natürlichen PPAR γ -Liganden 15-dPGJ₂ deutlich den Grad der Endotoxämie-verursachten Leber-Schädigung reduzieren konnte [102]. Weiterhin konnten Kaplan et al. im Maus-Sepsis-Modell eine erhöhte Überlebensrate der Tiere erreichen, wenn ihnen 3 h nach der intraperitonealen LPS-Injektion 15d-PGJ₂ verabreicht wurde. In den Lungen dieser Tiere konnte eine verminderte NF- κ B-Aktivität sowie eine erhöhte Expression und DNA-Bindung von PPAR γ festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die PPAR γ -vermittelte Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression durch NF- κ B als Ursache für die erhöhte Überlebensrate der Tiere postuliert [103]. Ein weiterer Hinweis auf die PPAR γ -vermittelte Hemmung der pro-inflammatorischen Phase der Sepsis lieferten Siddiqui et al. in einem Ratten-Sepsis-Modell. Hierbei wurde in Ratten mittels der CLP (‘cecal ligation and puncture’) eine polymikrobielle Sepsis ausgelöst. Diesen Ratten wurde intravenös der aus der Gelbwurzel stammende Farbstoff Curcumin verabreicht. Es konnte bereits in hepatischen Sternzellen gezeigt werden, dass Curcumin sowohl zur Induktion der PPAR γ -Expression, als auch zur Aktivierung von PPAR γ , allerdings auf noch nicht geklärtem Signalweg, führt [104]. Die Curcumin-Behandlung der Ratten, verhinderte die durch Sepsis-induzierte Erniedrigung der PPAR γ -Expression in der Leber. Dies führte zur Verminderung der Gewebeschäden, sowie zu einer geringeren TNF α -Expression in den septischen Ratten, welche zur erhöhten Überlebensrate der Tiere beitrugen. Da diese Effekte durch die Inkubation mit dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 wieder rückgängig gemacht werden konnten, war die Abhängigkeit von PPAR γ naheliegend [105].

Aufgrund der Hemmung pro-inflammatorischer Signalwege durch die Aktivierung von PPAR γ während der hyper-inflammatorischen Phase der Sepsis, wäre eine Therapie durch den Einsatz selektiver PPAR γ -Liganden, wie z. B. der TZDs denkbar. Allerdings kann auch, wie in 1.2.5.3 beschrieben, die Aktivierung von PPAR γ zur Induktion der Apoptose in T-Zellen führen, welche die während der hypo-inflammatorischen Phase der Sepsis auftretenden Lymphopenie verstärken könnte und somit die Mortalitätsrate steigern würde. Somit ist ein umfangreiches Verständnis hinsichtlich der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-

Zellen und der Wirkung der dafür notwendigen PPAR γ -Liganden, wie z. B. den bereits therapeutisch genutzten TZDs (1.2.4.2), elementar für die Entwicklung neuer Therapie-Konzepte, die auf der Aktivierung von PPAR γ basieren könnten.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung einer potentiellen pro-apoptischen Rolle von PPAR γ in T-Zellen bei der während der Sepsis auftretenden Lymphopenie. Des Weiteren stand die Untersuchung cytotoxischer Effekte der Thiazolidindione unabhängig von deren Fähigkeit zur Aktivierung von PPAR γ im Fokus dieser Arbeit. Hierbei sollten folgende experimentelle Schwerpunkte gesetzt werden:

- Im ersten Teil wurde untersucht, ob PPAR γ als potentieller pro-apoptischer Faktor in T-Zellen zur Lymphopenie während der Sepsis beitragen könnte. Hierbei sollte zunächst das Vorliegen der Lymphopenie mit Hilfe der Durchflusszytometrie in peripherem Blut septischer Patienten bestätigt werden.
- Anschließend sollte die mRNA-Expression von PPAR γ in T-Zellen septischer Patienten sowie deren Sensitivität hinsichtlich der beschriebenen PPAR γ -vermittelten Apoptose im Vergleich zu T-Zellen gesunder Spender überprüft werden.
- Weiterhin sollte überprüft werden, ob potentielle PPAR γ -Liganden, als Voraussetzung für die PPAR γ -vermittelte Apoptose im Blut septischer Patienten, mit Hilfe von Reporter-Analysen nachweisbar sind.
- Die mit Hilfe der Blutproben septischer Patienten identifizierte Korrelation zwischen auftretender Lymphopenie und erhöhter Sensitivität gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose in den T-Zellen septischer Patienten, sollte im Tier-Modell verifiziert werden.
- Hierzu sollten konditionelle T-Zell-PPAR γ -knock-out Mäuse gezüchtet werden, bei denen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen überprüft wird, in wie weit die Anwesenheit von PPAR γ in T-Zellen die Lymphopenie, welche durch die Induktion einer Sepsis (LPS bzw. CLP) ausgelöst wird, beeinflusst.
- Im zweiten Teil sollten in einem geeigneten Testsystem die PPAR γ -unabhängigen cytotoxischen Effekte der ausgewählten Thiazolidindione Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon in T-Zellen untersucht und dabei die Art des Zelltodes genau charakterisiert werden.
- Basierend auf den in der Literatur belegten Befunden, dass das Mitochondrium ein Ziel der TZDs darstellt, sollte mit Hilfe von SMPs als zellfreies Testsystem, der Einfluss der getesteten TZDs auf die mitochondriale Atmungskette näher untersucht.

- Schließlich sollten die im zellfreien SMP-Testsystem gewonnen Erkenntnisse auf das Zellmodell übertragen werden. Dabei wurde untersucht, in wie weit die beobachtete Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette für die nachgewiesenen cytotoxischen Effekte der getesteten TZDs verantwortlich sein könnte.

2 MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in kommerziell höchst erhältlichem Reinheitsgrad verwandt.

Acrylamid-Bis-Fertiglösung (40%, 37,5:1)	Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosin-Triphosphat (ATP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agar-Agar	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ampicillin	Biomol GmbH, Hamburg
Antimycin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Fluka GmbH, Buchs
Chloroform	Merk Eurolab GmbH, Darmstadt
Ciglitazon	Alexis Biochemicals, Grünberg
Coenzym A-Lithiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
n-Decylubiquinon (DBQ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Deoxy-D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein-Diacetat (H ₂ DCF-DA)	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
Dichlorphenolindophenol (DCIP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth GmbH, Karlsruhe
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
3,3'-Dihexyloxycarbocyaninjodid [DiOC ₆ (3)]	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH, Karlsruhe
D-Luziferin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylenglykoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ficoll-Lösung / Lymphozyten-Trennmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glyzerin	Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzin	Serva GmbH, Heidelberg
Hefeextrakt	Life Technologies, Paisley (Schottland)
HEPES	Roth GmbH, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
jetPEI™	Polyplus-Transfection, Illkirch (Frankreich)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Kanamycin	Biomol GmbH, Hamburg
LB-Broth (Lennox)	Roth GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumcarbonat-Hydroxid	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Mn(III)-tetrakis-(4-Benzoessäure)-porphyrin- chlorid (MnTBAP)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Methanol (MeOH)	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Natriumborat	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natrium-Succinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Orange G 6 x Gelladepuffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Para-Hydroxykumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
peqGold RNAPure™	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix	Invitrogen Corp., Carlsbad (USA)
UDG	
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteaseinhibitormix (PIM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rosiglitazon	Alexis Biochemicals, Grünberg
Rotenon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt
SOC-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Staurosporin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tetraethylendiamin (TEMED)	Roth GmbH, Karlsruhe
12-Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Thenoyltrifluoroaceton (TTFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-HCl	Roth GmbH, Karlsruhe
Trizin	Roth GmbH, Karlsruhe
Troglitazon	Alexis Biochemicals, Grünberg
Tween 20	Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

2.2 Standardpuffer und Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer:

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	0,1 mM

PBS:

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
pH	7,4

Leukozyten-Waschpuffer:

EDTA	2 mM
in PBS	

Leukozyten-Isolierungspuffer:

EDTA	2 mM
BSA	0,5% (w/v)
in PBS	

Luziferasesubstratlösung:

Trizin	20 mM
Magnesiumcarbonat-Hydroxid	1,07 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,67 mM
EDTA-K ⁺	100 µM
DTT	33,3 mM
ATP	530 µM
Coenzym A-Lithiumsalz	21,3 mg/l
D-Luziferin	470 mM

5-fach Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE):

Tris	445 mM
Natriumborat	445 mM
EDTA	10 mM

10-fach SDS-Laufpuffer:

Tris/HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
SDS	7 mM
pH	7,1

10-fach Blotting-Puffer:

Tris-HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
pH	8,3

10-fach TBS:

Tris-HCl	500 mM
NaCl	1,5 M
pH	7,4

1-fach TTBS:

TBS	1 x
Tween 20	0,06% (v/v)

Ponceau S-Lösung:

Ponceau S	0,1% (w/v)
Essigsäure	5% (v/v)

4-fach SDS-Probenpuffer:

Tris/HCl	125 mM
10% SDS	2% (v/v)
Glyzerin	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,002% (w/v)
DTT	5 mM
pH	6,9

ECL-Lösung:

0,1 M Tris	200 ml
Luminol	50 mg

Hydroxykumarinsäure-Lösung:

Para-Hydroxykumarinsäure 6,8 mM
in DMSO

5-fach Reporter-Lysepuffer:

Tris-H₃PO₄ 125 mM
DTT 10 mM
Triton-X-100 5% (v/v)
Glyzerin 50% (v/v)
pH 7,8

Genotypisierungs-Lysepuffer:

NaOH 25 mM
EDTA 0,2 mM
pH 12

Genotypisierungs-Neutralisierungspuffer:

Tris-HCl 40 mM
pH 5

PBS für Cytochrom *c*-Assay:

NaH₂PO₄ 2 mM
Na₂HPO₄ 16 mM
NaCl 150 mM
in PBS
pH 7,4

Digitonin-Lösung:

Digitonin 40 mM
in ddH₂O bei 97 °C zum Lösen erhitzen

Digitonin-Saccharose-Lösung:

Digitonin 150 µM
Saccharose 500 mM

SMP-Puffer:

NaH ₂ PO ₄	75 mM
MgCl ₂	1 mM
Na-EDTA	1 mM
pH	7,4

SMP-Verdünnungspuffer:

Saccharose	250 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
Tris-HCl	10 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	2 mM
pH	7,4

2.3 Kits

Annexin V-FITC/Propidiumjodid Apoptose Kit	Coulter-Immunotech GmbH, Hamburg
Advantage RT-for-PCR Kit	Clontech/Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Master Taq-Kit	Eppendorf, Hamburg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNA-Isolationskit: Genomic DNA Buffer Set und Genomic-tip 20/G	Qiagen GmbH, Hilden
Pan T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Standard DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.4 Antikörper**2.4.1 Antikörper für Western-Immunoblotting**

α-Cytochrom <i>c</i>	BD PharMingen, Hamburg
α-Maus (sheep IgG)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

2.4.2 Antikörper zur Zellisolierung und -analyse

α -CD3-Micro Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
α -CD3-APC	BD Biosciences, Heidelberg
α -CD3-FITC	Immunotools, Frisothe
α -CD3 ϵ -PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen, Heidelberg
α -CD4-FITC	Immunotools, Frisothe
α -CD8-PE	Immunotools, Frisothe
α -CD14-PE	Immunotools, Frisothe
α -CD19-FITC	Immunotools, Frisothe
α -CD66b-FITC	BD Biosciences, Heidelberg

2.5 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lymphozyten-Trennmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PBS (Instamed 9,55 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640, ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.6 Primer

Alle Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen.

Primer zur Detektion der humanen PPAR γ -mRNA mittels qPCR (3.5.4), (accession number NM138712; 213-495), T_A=52 °C:

PPAR γ _F1: 5'-ACT TTG GGA TCA GCT CCG-3'

PPAR γ _R1: 3'-AAG GTT GAG GGA GTA CCG-5'

Primer zur Detektion der humanen PPAR γ -mRNA mittels PCR (3.5.3), (accession number NM138712; 613-1324), T_A=62 °C:

PPAR γ _F2: 5'-CAT GCT TGT GAA GGA TGC AAG GG-3'

PPAR γ _R2: 3'-GGA CGC TTT CGG AAA ACC ACT GA-5'

Primer zur Detektion der humanen β 2-Mikroglobulin-mRNA mittels qPCR (3.5.4), (accession number NM004048; 69-368), $T_A=52$ °C:

β 2-Mikroglobulin_F: 5'-CTC CGT GGC CTT AGC TGT-3'

β 2-Mikroglobulin_R: 3'-CAT ACG GAC GGC ACA CTT-5'

Primer zur Detektion der humanen Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-mRNA (GAPDH) mittels PCR (3.5.3), (accession number NM002046; 76-1083), $T_A=63$ °C

GAPDH_F: 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GT-3'

GAPDH_R: 3'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GT-5'

Primer zur Detektion des PPAR γ -Wildtyp-Allels bzw. loxP-site flankiertes Exon 2 des PPAR γ -Allels für Genotypisierung (3.6), (basierend auf [106]), $T_A=60$ °C:

GT-PPAR γ _F: 5'-CTC CAA TGT TCT CAA ACT TAC-3'

GT-PPAR γ _R1: 5'-GAT GAG TCA TGT AAG TTG ACC-3'

Primer zur Detektion der Cre-vermittelten Deletion des Exon 2 des PPAR γ -Allels (3.6), (basierend auf [106]), $T_A=60$ °C:

GT-PPAR γ _F: 5'-CTC CAA TGT TCT CAA ACT TAC-3'

GT-PPAR γ _R2: 5'-GTA TCC TAT GGC TTC CAG TGC-3'

Primer zur Detektion der Cre (,cyclization recombinase') (accession number X03453) unter Kontrolle des lck-Promotors (3.6), (accession number NC000070), $T_A=60$ °C:

lck-Cre_F: 5'-TCC TGT GAA CTT GGT GCT TG-3'

lck-Cre_R: 5'-AAA AGA AAA CGT TGA TGC CG-3'

2.7 Vektoren

2.7.1 pcDNA3 PPAR γ 1 wt

Expressionsplasmid für den PPAR γ 1 wt, basierend auf dem pcDNA3-Plasmid der Invitrogen Corporation, Carlsbad. Der Vektor wurde freundlicherweise von Krishna Chatterjee (University of Cambridge) zur Verfügung gestellt.

2.7.2 pcDNA3 PPAR γ 1 AF2mut

Expressionsplasmid für die d/n PPAR γ AF2-Mutante, die zwei Mutationen in der LBD besitzt. Das Plasmid basiert auf dem pcDNA3-Plasmid der Invitrogen Corporation, Carlsbad, und wurde freundlicherweise von Krishna Chatterjee (University of Cambridge) zur Verfügung gestellt.

2.7.3 p(AOX)₃-TK-luc Plasmid

Dieses Plasmid wurde 1992 von Tugwood und Issemann et al. beschrieben [107] und stellt ein Luziferase-Reporterplasmid dar, bei dem drei PPREs vor den minimalen Thymidinkinase Promotor kloniert vorliegen. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von C.K. Glass (University of California, La Jolla) zur Verfügung gestellt.

2.8 Zelllinien und Bakterienstämme

XL1-Blue Super kompetente Bakterien

Stratagene GmbH, Amsterdam

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)].

Jurkat T-Zellen

DSMZ: ACC 282

Jurkat T-Zellen entstammen einem 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphoblastärer Leukämie (ALL) litt. Es ist eine T-Zelllinie, die 1977 etabliert wurde [108].

Primäre humane Zellen

T-Zellen wurden am Tag der Blutentnahme aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern (n=10) und Intensiv-Patienten, bei denen eine Sepsis per Definition [88] vorlag, gesammelt. Die Blutproben der Sepsis-Patienten (n=15) wurden freundlicherweise von der Medizinischen Abteilung IV des Universitätsklinikums Erlangen, sowie des Westpfalz-Klinikums Kaiserslautern zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen Bayern and Rheinland-Pfalz genehmigt. Aufgrund des geringen Blutprobevolumens konnten nicht alle im Ergebnisteil dargestellten Experimente mit den gleichen Proben durchgeführt werden.

Primäre murine Zellen

Murine Leukozyten und T-Zellen wurden, wie in Methoden 3.4 beschrieben, aus den Milzen von lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen isoliert. Diese Mäuse wurden durch Kreuzung von C57BL/6N-PPAR $\gamma^{fl/fl}$ mit C57BL/6NTac-(Tg) (lck-Cre) gezüchtet.

2.9 MauslinienC57BL/6N-PPAR $\gamma^{fl/fl}$

wurde freundlicherweise von

L. Hennighausen (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt

C57BL/6NTac-(Tg) (lck-Cre)

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA

2.10 Geräte und sonstige Materialien

Autoklav HV 85

BPW GmbH, Süssen

autoMACS™

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

B250 Sonifier

Branson Ultrasonics, Danbury (USA)

Bakterieninkubator B5042

Heraeus GmbH, Hanau

Bakterienkultur Sterilbank UVUB 1200

Uniequip GmbH, Martinsried

BD Vacutainer™

BD Biosciences GmbH, Heidelberg

CASY®

Schärfe System, Reutlingen

Doppelstrahl-Spektralphotometer UV 300

Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Shimadzu

FACSCalibur Durchflusszytometer und

BD Biosciences GmbH, Heidelberg

FACSCanto Durchflusszytometer

Filmentwicklermaschine Optimax Typ TR

MS Laborgeräte Schroeder OHG,

Wiesbaden

FlowCount™ Fluorospheres

Beckman Coulter, Krefeld

Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 200M

Zeiss, Göttingen

Holten LaminAir Sterilbank

Jouan GmbH, Unterhaching

Hybond-C extra Nitrozellulose Membran

Amersham Biosciences GmbH, Freiburg

i-Cycler™ MyiQ™

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Real-Time PCR System

IG 150 (Zellkulturinkubator)	Jouan GmbH, Unterhaching
Magnetrührer Combimag RCH	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen
Mastercycler Thermocycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
Medimaschine	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Mini-PROTEAN 3 System (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiscan RC Luminometer	Thermo Labsystems, Vantaa (Finnland)
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Oxygraph-2K	Oroboros, Innsbruck (Österreich)
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Eppendorf GmbH, Köln
Plastikmaterial (Zellkultur)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reinstwasseranlage Purelab Plus	ELGA LabWater GmbH, Siershahn
Schüttelinkubator LabLine Orbit Shaker	Uniequip GmbH, Martinsried
Shimadzu MultiSpec-1501 diode array spectrophotometer	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Sub-Cell [®] GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
^{SUPER} RX X-Ray Film	Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Trans-Blot SD Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallhomogenisator Ultra-Sonifier	MSE, Loughborough (England)
UV-Transilluminator	Raytest GmbH, Straubenhardt
Geldokumentationssystem	
Whatman Papier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge CR 3.22	Jouan GmbH, Unterhaching
Zentrifuge MR 23i	Jouan GmbH, Unterhaching
Zentrifuge ZK380	Hermle GmbH, Wehingen

2.11 Software

Ascent Software, Version 2.4.2.	Labsystems, Helsinki (Finnland)
AxioVision Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
BD Cell Quest Pro	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
BD FACSDiva [™] Software	BD Biosciences GmbH, Heidelberg

DatLab 4.0

Oroboros, Innsbruck (Österreich)

GenrelX

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

MyiQ

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

Die Kultur der humanen T-Zelllinie Jurkat, 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% CO₂-Gehalt inkubiert. Die in Suspension kultivierten Jurkat T-Zellen konnten alle 3 bis 4 Tage, nach dem Zentrifugieren [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 Tiere und Tierhaltung

Verwendet wurden konditionelle PPAR γ -knock-out-Mäuse, bei denen das Exon 2 des PPAR γ -Gens durch loxP-sites flankiert ist. Zur Zucht von Zelltyp-spezifischen PPAR γ -knock-out-Mäusen wurden diese mit Ick-Cre-Mäusen gekreuzt. Die Tiere wurden in H-Temp-Polysulphon-Käfigen mit Filterhaube (Tecniplast, Hohenpreißenberg) mit je 5 bis 10 Mäusen pro Käfig auf Einstreu bei Pressfutter (R/M-Haltung, 10 mm Pellets Ratte/Maus, SSNIFF, Soest) sowie Wasser ad libitum im Tierstall der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, gehalten.

3.3 Isolation und Analyse von primären humanen Zellen aus peripherem Blut

3.3.1 Isolation von primären humanen T-Zellen

Die Apoptose-Messungen und die qPCR-Analyse erforderten eine Anreicherung der T-Zellen aus dem Vollblut der gesunden Spender sowie der Sepsis-Patienten. Zunächst wurden mit Lymphozyten-Trennmedium die PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) in einer Dichtegradientenzentrifugation (1000 x g, 10 min, RT) von den übrigen Blutbestandteilen separiert und anschließend die T-Zellen (CD3⁺) mit der MACS Technologie isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Miltenyi Biotec GmbH. Um die Reinheit der gewonnenen Zellpopulationen zu bestätigen, wurden 20 μ l der Zellsuspension für 20 min mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper (α -CD3-FITC) inkubiert und im Durchflusszytometer mit der Fluoreszenz 1 (Ex 488 nm/Em 530/30 nm)

analysiert. Die Reinheiten betragen $\geq 97\%$. 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.

3.3.2 Analyse von Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Für die Analyse der Subpopulationen der PBMCs wurde das Spenderblut 8 min mit 5 Vol Erythrozyten-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 Erythrozyten-Lysepuffer durchgeführt. Zum spezifischen Nachweis einzelner Leukozyten-Subpopulationen mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACSCalibur bzw. FACSCanto) wurden die Zellen mit folgenden spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern für 20 min inkubiert:

<i>Leukozyten-Subpopulation</i>	<i>Fluoreszenz-markierter Antikörper bzw. Antikörper-Mix</i>
Granulozyten (CD66b ⁺)	α -CD66b-FITC
Monozyten (CD14 ⁺ CD66b ⁻)	α -CD14-PE und α -CD66b-FITC
B-Zellen (CD19 ⁺)	α -CD19-FITC
T-Zellen (CD3 ⁺)	α -CD3-FITC
T-Helferzellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	α -CD3-FITC und α -CD4-PE
Cytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	α -CD3-FITC und α -CD8-PE

Die Bestimmung des Verhältnisses von T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺) zu cytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) erfolgte durch ‚Gaten‘ auf die Lymphozyten-Population in der ‚Forward/Side Scatter‘ (FSC/SSC)-Analyse und der zusätzlichen Inkubation mit α -CD4-FITC und α -CD8-PE.

Die Quantifizierung erfolgte in der FSC/SSC-Ansicht anhand der Cell Quest Pro Software bzw. der FACSDiva Software (BD Biosciences) durch das Festsetzen von Regionen um die durch die Antikörper-Färbung definierten Subpopulationen. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen der Leukozyten-Subpopulationen pro μ l Blut, wurden den bereits markierten Proben fluoreszierende FlowCountTM Fluorospheres (Beckman Coulter), den Herstellerangaben entsprechend, zugegeben und somit die absolute Zellzahl berechnet.

3.4 Isolation und Analyse muriner T-Zellen aus der Milz

3.4.1 Isolation der murinen Leukozyten aus der Milz

Die verwendeten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und unmittelbar die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Bis zur Isolation der Leukozyten wurde die Milz in einem 50 ml Falcon mit 3 ml PBS auf Eis aufbewahrt. Mit Hilfe der Medimaschine (BD Biosciences GmbH, Heidelberg) wurden die Leukozyten aus der Milz, den Herstellerangaben entsprechend, durch mechanische Disruption isoliert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 500 x g, 5 min, 4 °C) und durch die Verwendung von Erythrozyten-Lysepuffer, wie in 3.3.2 beschrieben, von Erythrozyten befreit. Aus den nun erhaltenen Leukozyten wurden anschließend die T-Zellen isoliert.

3.4.2 Isolation muriner T-Zellen aus der Leukozytenfraktion und Extraktion der genomischen DNA

Die aus 3.4.1 erhaltenen Leukozyten aus der Milz wurden mit Hilfe des CASY[®] (Schärfe System, Reutlingen) gezählt und entsprechend dem Protokoll des Mouse Pan T Cell Isolation Kits (Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach) die T-Zellen mit Hilfe des autoMACS[™] (Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach) durch negative Selektion isoliert. Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen T-Zellen wurden diese mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper (α -CD3 ϵ -PerCP-Cy5.5, BD Pharmingen, Heidelberg) gefärbt und im Durchflusszytometer (FACSCanto) analysiert. Die Reinheit betrug durchschnittlich 90%. Aus den Zellen der negativen Fraktion (T-Zellen) und der positiven Fraktion (restliche Leukozyten) wurde anschließend die genomische DNA mit Hilfe des DNA-Isolationskits (Genomic DNA Buffer Set und Genomic-tip 20/G, Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

3.5 mRNA-Isolation und PCR-Analysen

3.5.1 Isolation der mRNA

Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT), der Überstand abgezogen und das Zellsediment in 1 ml peqGold RNAPure[™] lysiert. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Das Gemisch wurde 15 sec geschüttelt und weitere 10 min bei RT stehen gelassen. Die anschließende Zentrifugation (12000 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 zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4 °C), der Isopropanolüberstand entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Das Erhitzen der RNA-Lösung auf 55 °C verbesserte die Löslichkeit. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Eine OD (optische Dichte) bei 260 nm von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Der Quotient aus OD_{260 nm}/OD_{280 nm} wurde zur Bestimmung der Reinheit genutzt. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden 1 µg der RNA zusammen mit den Reagenzien des Advantage RT-for-PCR Kits (Clontech/Takara Bio Europe) pipettiert und, dem Standardprotokoll des Herstellers folgend, im Thermocycler inkubiert. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert oder sofort in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. quantitativen PCR (qPCR) eingesetzt.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden definierte Bereiche diverser Gene (2.6) exponentiell amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden entsprechend dem Standardprotokoll (Eppendorf) mit je 10 µl komplementärer DNA (cDNA) bzw. 10 ng genomischer DNA, 3 µl 5'-Primer [5 µM], 3 µl 3'-Primer [5 µM] sowie den Reagenzien des Master Taq-Kits (Eppendorf) angesetzt und in einem Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert:

PCR-Inkubationsschema:

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	1 min	94 °C	35 Zyklen
Primer-Anlagerung	1 min	T _A °C	
Elongation	90 sec	72 °C	
Abschließende Elongation	7 min	72 °C	

3.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde der i-CyclerTM der Firma BioRad GmbH mit dem Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG der Fa. Invitrogen Corp., Carlsbad verwendet. Der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green der Fa. Molecular-Probes diente hierbei zur Quantifizierung des amplifizierten PCR-Produktes. Mit Hilfe der qPCR wurde die PPAR γ - und β 2-Mikroglobulin-mRNA-Expression in T-Zellen, die aus gesunden Spendern und Sepsis-Patienten isoliert wurden, untersucht. Hierzu wurde die cDNA der Zellen in der qPCR mit den entsprechenden Primern (2.6) eingesetzt. Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l folgendermaßen angesetzt:

Template (cDNA)	4 μ l
Primer_F [10 μ M]	0,4 μ l
Primer_R [10 μ M]	0,4 μ l
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix	10 μ l
ddH ₂ O	5,2 μ l

Die Abfolge der Reaktionsschritte wurde nach Angaben des Herstellers folgendermaßen gewählt:

Aktivierung der Polymerase	2 min	50 °C	
Denaturierung	15 min	95 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	50 x
Primer-Anlagerung	30 sec	T _A °C	
Elongation	30 sec	72 °C	
Finale Denaturierung	1 min	95 °C	

β 2-Mikroglobulin: T_A = 52 °C; PPAR γ : T_A = 52 °C

Jeweils nach der Elongation wurde die Fluoreszenz gemessen und für die Auswertung herangezogen. Sie ist ein Maß für die Anzahl der gebildeten PCR-Produkte. Nach der finalen Denaturierung wurde die Temperatur der Proben auf 55 °C abgekühlt und schrittweise alle 20 sec um 0,5 °C bis auf 95 °C erhitzt. Nach jedem Temperaturanstieg wurde die Fluoreszenz gemessen. Auf diese Weise konnte die Anzahl der in der Reaktion entstandenen Produkte und deren Schmelzpunkte ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der von der BioRad GmbH mitgelieferten Software MyiQ.

3.6 Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR

Die Genotypen der transgenen Mäuse wurden mit Hilfe der PCR-Analyse bestimmt. Hierzu wurden Ohrstücke mit ca. 1 mm Durchmesser in 70 µl Genotypisierungs-Lysepuffer für 20 min bei 100 °C gekocht. Nach 1 min Inkubation auf Eis wurden 70 µl Genotypisierungs-Neutralisierungspuffer zugegeben. Nicht-lysiertes Gewebe wurde durch Zentrifugation (12000 x g, 15 sec, 4 °C) sedimentiert. Vom Überstand, der die genomische DNA enthielt, wurden 2,5 µl für die PCR-Analyse entnommen. Der PCR-Reaktionsansatz erfolgte nach folgendem Schema:

vom Überstand	2,5 µl
ddH ₂ O	37,5 µl
Reaktionspuffer (10 x)	5 µl
Primer_F [5 µM]	1,5 µl
Primer_R [5 µM]	1,5 µl
dNTP-Mix [10 mM]	0,75 µl
Enzym-Mix	1 µl

Die Primerkombination GT-PPAR γ _F und GT-PPAR γ _R1 (2.6) amplifiziert ein 225 bp großes Produkt, welches auf das Wildtyp-Allel zurückzuführen ist, wogegen ein 275 bp großes Produkt entsteht, wenn mindestens ein PPAR γ -Allel das loxP-site flankierte Exon 2 des PPAR γ -Gens aufweist. Durch die Primerkombination GT-PPAR γ _F und GT-PPAR γ _R2 (2.6) entsteht ein 400 bp Produkt, sofern das Exon 2 im PPAR γ Gen durch die Cre-Reaktion deletiert wurde. Zur Identifizierung der transgenen Cre-Mäuse diente die Primerkombination lck-Cre_F und lck-Cre_R (2.6).

Die PCR-Reaktion wurde mit dem in (3.5.3) beschriebenen Programm bei den entsprechenden Primer-Annealing-Temperaturen (T_A) durchgeführt und die entstanden PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (3.8) aufgetrennt.

3.7 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µl der Nukleinsäure-Lösung auf die entsprechende Messvorrichtung pipettiert und die Absorption bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Die Absorption bei 230 nm ist dabei zum Proteingehalt, bei 260 nm zum DNA-Gehalt und bei 280 nm zum

RNA-Gehalt proportional. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure-Lösung.

3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten (z.B. nach Kontrollverdau bzw. nach PCR-Analysen) wurde wie folgt durchgeführt. Das Agarosegel wurde hergestellt, indem Agarose (1,5%) in 0,5-fachem TBE aufgekocht wurde. Die Schmelze wurde in eine Form gegossen, in der sich Kämme zur Probenbeladung befanden. Die Polymerisation des Gels erfolgte während der Abkühlung bei Raumtemperatur. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 6-fachem Gelladepuffer gemischt und in jeweils eine Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden in eine separate Geltasche 5 µl eines Größenmarkers pipettiert (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder, Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Die Auftrennung erfolgte 1 bis 2 h bei 5 bis 8 V/cm in 0,5-fachem TBE. Anschließend wurde das Gel ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und die DNA-Fragmente mit einem Geldokumentationssystem (UV-Transilluminator, Raytest GmbH, Straubenhardt) unter UV-Licht mit 254 nm Wellenlänge detektiert.

3.9 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Die in 2.7 zur Verfügung gestellten Vektoren mussten für die Transfektionen in die Zellen in genügender Menge zur Verfügung stehen. Daher wurden sie für die Vervielfältigung in Bakterien transformiert. Ein 50 µl Aliquot superkompetenter *E. coli*-Bakterien (XL1-blue, Stratagene) wurde hierzu auf Eis aufgetaut und 0,85 µl 1,42 M β-Mercaptoethanol-Lösung zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Schütteln wurden 0,5 bis 1 µg des entsprechenden Plasmids zupipettiert und vorsichtig mit den Bakterien gemischt. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Bakterien für 45 sec in einem auf 42 °C vorgeheizten Wasserbad erhitzt und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Es folgte nach 2 min die Zugabe von 200 µl SOC-Medium und ein Schütteln der Bakterien für 60 min bei 37 °C und 300 U/min. Von der Bakteriensuspension wurden anschließend 100 bis 250 µl auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatte enthielt ein Selektionsantibiotikum, gegen das eine Resistenz auf dem zu amplifizierenden Vektor kodiert war. Dadurch konnten nur die Bakterien wachsen, die erfolgreich mit dem Plasmid transformiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C in einem Bakterieninkubator wurde die Platte mit den gewachsenen Kolonien bei 4 °C gelagert.

3.10 Bakterienkultur

Vorbereitend für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 2 ml LB-Medium in einem sterilen Bakterienkulturröhrchen mit je einer Bakterienkolonie einer bewachsenen LB-Agarplatte angeimpft. Das LB-Medium enthielt zusätzlich ein Selektionsantibiotikum für das zu amplifizierende Plasmid. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C in einem Bakterieninkubator bei 300 U/min geschüttelt. Für den Ansatz einer Plasmid-Maxi-Präparation wurden 150 ml LB-Medium in einem sterilen 1 l Erlenmeyerkolben mit Bakterien einer vorherigen Plasmid-Mini-Präparation oder einer Glyzerinkultur angeimpft. Das LB-Medium enthielt ebenfalls ein Selektionsantibiotikum und die Kultivierung erfolgte wie zuvor beschrieben. Zur längeren Lagerung von Bakterien wurde eine Glyzerinkultur angelegt, indem 500 µl einer Bakterien-Übernachtskultur mit 500 µl Glyzerin vermischt und bei -80 °C eingelagert wurden.

3.11 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde je nach gewünschter Plasmidmenge eine Plasmid-Mini-Präparation (bis 20 µg Plasmid: QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen GmbH, Hilden) oder eine Plasmid-Maxi-Präparation (>20 µg Plasmid: HiSpeed Plasmid Maxi Kit, Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Hierbei wurden die Bakterien einer Übernachtskultur nach Herstellerangaben aufgeschlossen und das Plasmid aufgereinigt.

3.12 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Nach jeder erneuten Amplifikation von Plasmiden wurde ein Kontrollverdau angesetzt. Bei der Durchführung von Restriktionsverdauen wurden die jeweiligen Restriktionsendonukleasen und die zugehörigen Puffer nach Angaben der Hersteller verwendet. Die Restriktionen erfolgten für 2 h bei 37 °C, anschließend wurden die Endonukleasen 20 min bei 65 °C inaktiviert. Beim Verdau eines Plasmids mit mehreren Enzymen, wurden diese gleichzeitig in einem Ansatz inkubiert, und der entsprechende vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

3.13 Zelltod-Analysen zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose

3.13.1 Detektion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_M$

Zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\Psi_M$) wurde das Fluorochrom DiOC₆(3) verwendet. DiOC₆(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 $[\lambda] = 501 \text{ nm}$.

Nach Beendigung der individuellen Behandlung, wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension mit 40 nM DiOC₆(3) für 30 min inkubiert. Es folgte die unmittelbare Vermessung der Proben bei Fluoreszenz 1 (Ex 488 nm/Em 530/30 nm) an dem Durchflusszytometer mit Unterstützung der BD Cell Quest Pro-Software bzw. der BD FACSDiva Software. Dabei wurden mindestens 10000 Zellen bei der Messung detektiert.

3.13.2 Nachweis der Phosphatidylserintranslokation mit Annexin V

Eine der Veränderungen an der Zelle, die während der Apoptose stattfindet, 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 beim Zelltod infolge von Apoptose, sondern ebenso von Nekrose nachweisbar. 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 Propidiumjodid (PI) durchlässig wird. PI ist ein DNA-interkalierendes Fluorochrom (Ex 550 nm/Em 617 nm). Zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose wurde das Annexin V-FITC/Propidiumjodid Apoptose Kit (Coulter-Immunotech) eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) liegt bei 492 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm.

Nach einer Zentrifugation (500 x g, 5 sec, 4 °C) wurde die Zellzahl der geernteten Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml Bindungspuffer (1 x) eingestellt. Zu 100 µl der Zellsuspension wurden 5 µl Annexin V-FITC sowie 2,5 µl PI [0,5 µg/µl] 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 FACSCalibur bzw. FACSCanto und mit Hilfe der BD Cell Quest Pro Software bzw. der BD FACSDiva 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.

3.13.3 DAPI-Färbung

Im Verlauf der Apoptose erfolgt der enzymatische Abbau der genomischen DNA, welcher durch die DAPI-Färbung (Ex 358 nm/Em 461 nm) in Form von kondensiertem Chromatin

bzw. bereits fragmentierter Zellkerne nachgewiesen werden kann. Nach den angegebenen Stimulationen wurden 5×10^5 Jurkat T-Zellen in PBS gewaschen und anschließend in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für 25 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 5 min mit PBS wurden die Zellen durch eine 0,2%-ige Triton-X 100-Lösung permeabilisiert. Schließlich wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit einer DAPI-Lösung (6×10^{-7} M) für 10 min gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) mit Hilfe der AxioVision Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen).

3.13.4 Nachweis der Cytochrom *c*-Freisetzung

Ein für den Ablauf des apoptotischen Programmes wichtiger Vorgang, ist die Cytochrom *c*-Freisetzung in das Cytosol, wo es als Bestandteil des so genannten Apoptosoms zur Aktivierung der Caspase-9 führt (1.1.2). Diese Freisetzung als Kennzeichen der Apoptose wurde mit Hilfe der Western-Immunoblotting-Analyse (3.14) nachgewiesen.

Hierfür wurden 4×10^6 Jurkat T-Zellen durch eine 5-minütige Zentrifugation bei $500 \times g$, 21°C geerntet und in $250 \mu\text{l}$ PBS für das Cytochrom *c*-Assay bei Raumtemperatur resuspendiert. Anschließend wurden $250 \mu\text{l}$ einer Digitonin/Saccharose-Lösung ($150 \mu\text{M}$ Digitonin, 500 mM Saccharose) hinzupipettiert und nach einer Inkubation von 30 sec für eine Minute bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Das entstandene Pellet, welches die Mitochondrienfraktion enthielt, wurde in $40 \mu\text{l}$ der Digitonin/Saccharose-Lösung resuspendiert, mit 4-fachem SDS-Probenpuffer versehen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Überstand, welcher die cytosolische Fraktion mit freigesetztem Cytochrom *c* enthielt, wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry (3.14.1) durchgeführt. Anschließend wurden $30 \mu\text{g}$ Protein der cytosolischen Fraktion mit 4-fachem SDS-Probenpuffer versehen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proteine der cytosolischen Fraktionen, sowie der Mitochondrienfraktionen wurden durch die folgende SDS-PAGE (3.14.2) separiert und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (3.14.2). Mit Hilfe eines α -Cytochrom *c*-Antikörpers (PharMingen, Hamburg) wurde das Cytochrom *c*-Protein immunochemisch detektiert (3.14.3).

3.14 Western-Immunoblotting

3.14.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Messung der Proteinkonzentration, basierend auf der Methode nach Lowry [109], wurde mit Hilfe des Standard DC Protein Assay Kits (BioRad GmbH, München) durchgeführt. Als

Standard zum Ermitteln der Proteinkonzentration wurde BSA in Lysepuffer in verschiedenen Konzentrationen gelöst (0,625 µg/µl, 1,25 µg/µl, 2,5 µg/µl, 5 µg/µl, 10 µg/µl), als Nullprobe wurde Lysepuffer ohne Proteine verwendet. Von den Standards, der Nullprobe und dem zu messenden Zellextrakt wurden je 2 µl in je 2 Kammern einer 96-Loch-Platte pipettiert. Für die Farbreaktion wurden zusätzlich in jede Kammer 20 µl Reagenz A und 160 µl Reagenz B des Assay Kits pipettiert und die Platte 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung der Proben im Multiscan RC Luminometer bei einer Wellenlänge von 750 nm und der Ascent Software, Version 2.4.2.

3.14.2 SDS-PAGE und Proteintransfer auf die Membran

Zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die in 3.13.4 bereits beschriebenen Fraktionen (cytosolische Fraktionen und Mitochondrienfraktionen) wurden in die Taschen eines Polyacrylamidgels pipettiert. Dieses bestand aus einem 4%-igen Sammelgel und einem 15%-igen Trenngel und wurde nach folgendem Schema angesetzt:

4%-iges Sammelgel:

40%	Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1	0,3 ml
0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8	0,75 ml
10%	SDS	30 µl
	ddH ₂ O	1,92 ml
10%	APS	50 µl
	TEMED	5 µl

15%-iges Trenngel:

40%	Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1	3,75 ml
1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10%	SDS	0,1 ml
	ddH ₂ O	3,65 ml
10%	APS	50 µl
	TEMED	5 µl

Für die Durchführung der Proteintrennung und für das Gießen der Gele wurde das Mini-PROTEAN 3 System der Fa. BioRad GmbH, München, verwendet, sowie 1-facher SDS-Laufpuffer.

Nach dem Aufbau der Apparatur wurde die denaturierte Proteinprobe in eine Tasche des Sammelgels pipettiert. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde in eine separate Tasche der Marker Prestained Protein Ladder der Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, aufgetragen. Die Passage der Proteine durch das Sammelgel bis zur Phasengrenze zum Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 70 V, die Auftrennung im Trenngel bei einer Spannung von 120 V. Anschließend wurden die Proteine für die weitere Analyse auf eine Hybond C extra Nitrozellulose Membran (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) transferiert. Dazu wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel zwischen Whatman-Papier in einer Blot-Apparatur (Trans-Blot SD, BioRad GmbH, München) positioniert. Die Whatman-Papiere wurden zuvor in 1-fachem Blotting-Puffer/20% Methanol getränkt. Der Transfer erfolgte 105 min bei 70 mA je Gel. Anschließend wurden die auf der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen.

3.14.3 Detektion

Zur Detektion der Proteine auf der Membran wurde ein immunochemisches Verfahren verwendet. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch 60 min Inkubation in Blockierungspuffer (1-fach TTBS/5% Milchpulver) abgesättigt. Die Bindung des primären α -Cytochrom *c*-Antikörpers, der 1:1000 in 3 ml Blockierungspuffer verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper stammt aus der Maus und bindet an das Cytochrom *c*-Protein. Anschließend wurde die Membran dreimal je 10 min in Waschpuffer gewaschen (1-fach TTBS) und der sekundäre Antikörper (α -Maus 1:2000 in Blockierungspuffer) 45 bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären und ist an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Nach erneutem Waschen (dreimal 10 min in 1-fach TTBS) wurde die Membran 2 min in 2,5 ml ECL-Lösung inkubiert, die zusätzlich 25 μ l Hydroxykumarinsäure und 1,5 μ l 30% H₂O₂ enthielt. Die Meerrettichperoxidase des sekundären Antikörpers katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, wodurch die markierten Bereiche der Membran Licht emittieren und durch Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden. Die Expositionszeit betrug zwischen 15 und 45 sec.

3.15 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die transiente Transfektion von Jurkat T-Zellen wurde mit Hilfe des jetPEITM-Transfektionsreagenz der Fa. Polyplus-Transfection durchgeführt. Dabei schließt ein lineares Polyethylenimin (PEI) die zu transfizierende DNA (siehe 2.7) in positiv geladene Partikel ein, die mit den negativ geladenen Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren und durch

Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Durch das positiv geladene jetPEI wird der endosomale pH-Wert gepuffert und die Degradation der DNA verhindert. Die Transfektion wurde in 24-Loch-Zellkulturplatten nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte 24 h nach deren Transfektion.

3.16 Luziferase-Assay

Das Luziferase-Assay ist ein Reporter-Gen-Assay, bei dem Zellen mit einem Reporterplasmid (siehe 2.7) transient transfiziert werden. Versuchsspezifisch wird das auf dem Reporterplasmid befindliche Enzym Luziferase exprimiert, welches die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luziferin katalysiert. Dabei wird Licht der Wellenlänge 562 nm freigesetzt, das im Luminometer nachgewiesen werden kann. Die Versuche wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, 24 h nach Transfektion mit dem Reporterplasmid. Nach den im Ergebnisteil angegebenen Stimulationszeiten wurden die Zellen lysiert, indem die Zellen in 100 µl Reporter-Lysepuffer aufgenommen, schockgefroren und dann bei -80 °C über Nacht gelagert wurden. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und 15 min geschüttelt (750 U/min). Durch einen Zentrifugationsschritt von 2 min bei 12000 x g, RT wurden die lysierten Zellfragmente pelletiert, die gebildete Luziferase blieb im Überstand. Anschließend wurden je Ansatz 50 µl des Überstandes in 5 ml Kunststoffröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt, 100 µl Luziferase-Substratlösung zugegeben und nach 20 sec Inkubation die Chemilumineszenz im Luminometer gemessen.

Die folgenden Analysen zur Untersuchung der Komplex I- und Komplex II-Aktivitäten in submitochondrialen Partikeln erfolgten in Kooperation mit Dr. Stefan Dröse und Ilka Siebels von der Arbeitsgruppe Molekulare Bioenergetik, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Brandt.

3.17 Isolation von submitochondrialen Partikeln aus dem Rinderherz

Die Isolation der mitochondrialen Membranen sowie der submitochondrialen Partikel (SMPs) aus dem Rinderherz erfolgte wie von Okun et al. (1999) beschrieben [110].

3.17.1 Präparation der mitochondrialen Membranen aus dem Rinderherz

Die hierfür notwendigen Rinderherzen wurden vom Schlachthof in Aschaffenburg bezogen und in einer Kühlbox für den Transport gelagert. Anschließend wurden direkt die mitochondrialen Membranen nach der Methode von Smith et al. (1967) isoliert [111]. Die

Membranen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.17.2 Isolation der submitochondrialen Partikel aus dem Rinderherz

Die submitochondrialen Partikel wurden nach der Methode von Thierbach & Reichenbach (1981) aus den in 3.17.1 gewonnenen mitochondrialen Membranen isoliert [112], mit folgenden von Okun et al. beschriebenen Modifikationen [110]:

Die in 3.17.1 gewonnenen mitochondrialen Membranen wurden auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit dem SMP-Verdünnungspuffer (2.2) eingestellt. Jeweils 25 ml Portionen dieser Verdünnung wurden bei Lagerung in einem Eisbad zehnmal für 15 sec mit einer 3 mm Mikrospritze eines Ultraschallgerätes (B250 Sonifier, Branson Ultrasonics, Danbury/UK), bei maximaler Schalleistung sonifiziert. Diese beschallten Portionen wurden vereinigt und 10 min bei 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Gefäße überführt und die SMPs durch eine Zentrifugation bei 100000 x g für 45 min bei 4 °C sedimentiert. Die im Pellet befindlichen SMPs wurden in SMP-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt (67 mg/ml) sowie der Gehalt an Cytochrom *b* (34,8 µM) und Cytochrom *a/a3* (39,2 µM) bestimmt (3.17.3). Anschließend wurden die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen SMPs bis zu den Messungen bei -80 °C gelagert.

3.17.3 Bestimmung der Cytochromgehalte

Die Bestimmung der Cytochromgehalte erfolgte durch Aufnahme von Differenzspektren in einem Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV 300 Shimadzu, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg). Hierfür erfolgte eine Reduktion der Probe durch die Zugabe von Natriumdithionit, wogegen die Referenz mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert wurde. Die Berechnung der jeweiligen Cytochromgehalte erfolgte unter Verwendung der von Brandt et al. (1989) angegebenen Extinktionskoeffizienten [113]:

Cytochrom *b*: $\epsilon_{562-575} \text{ nm} = 28,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Cytochrom *c* bzw. *c₁*: $\epsilon_{550-545} \text{ nm} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Cytochrom *c* Oxidase: $\epsilon_{605-630} \text{ nm} = 24,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

3.18 Messung der Aktivitäten der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette

3.18.1 Bestimmung der Komplex I-Aktivität (NADH-Oxidase und NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase)

Die NADH-Oxidase-Aktivität des Komplexes I wurde anhand des Sauerstoff-Verbrauches mit Hilfe eines Oxygraphen (Oxygraph-2k, Oroboros, Österreich) ermittelt. Hierfür wurden SMPs (33,5 µg Protein) in 2 ml O₂-gesättigten SMP-Puffer bei 25 °C in die luftdichte Messzelle des Oxygraphen gegeben. Durch die Inkubation mit 0,5 mM NADH als Substrat wurde die Komplex I-abhängige Atmung gestartet. Dieser laufenden Reaktion wurden die im Ergebnisteil angegebenen Substanzen kumulativ zugegeben und die Atmungsrate für jeweils 2 bis 3 min bei 25 °C bestimmt. Die Bestimmung der Atmungsraten (J-O₂: pmol sec⁻¹ mg⁻¹) erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware DatLab 4.0. Zur Ermittlung von IC₅₀-Werten wurden die Daten ggf. in das Programm Excel übertragen und die Atmungsraten der unbehandelten Kontrollen gleich 100% gesetzt.

Zur Messung der spezifischen Komplex I-Aktivität (NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität) wurden die SMPs (23,5 µg pro Ansatz) bei 30 °C in SMP-Puffer in Gegenwart von 2 mM KCN inkubiert. Nach Zugabe der Substrate 100 µM NADH und 100 µM DBQ (*n*-Decylubiquinon) und ggf. von den untersuchten Substanzen wurde die Rate der NADH-Oxidation ($\epsilon_{340-400 \text{ nm}} = 6,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu Multi Spec-1501 diode array spectrophotometer, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) ermittelt.

3.18.2 Bestimmung der Komplex II-Aktivität (Succinat-Oxidase und Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase)

Die Messung der Succinat-Oxidase-Aktivität (Komplex II-abhängige Atmungsrate) erfolgte unter vergleichbaren Bedingungen im Oxygraphen (siehe 3.18.1) allerdings mit 67 µg Protein und Natrium-Succinat als Substrat des Komplexes II. Die Ermittlung der Atmungsraten und ggf. von IC₅₀-Werten erfolgte wie unter 3.18.1 beschrieben. Zur Bestimmung der direkten Komplex II-Aktivität (Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität) wurden die SMPs (67 µg) in SMP-Puffer inkubiert, der Na-Succinat als Substrat des Komplexes II enthielt. Durch die Zugabe der Inhibitoren für den Komplex I (Rotenon 1,5 µM), den Komplex III (Antimycin A 3 µM) und den Komplex IV (KCN 2 mM) für 10 min bei 25 °C wurde gewährleistet, dass die anschließenden Messungen alleine auf die Aktivität des Komplexes II zurückzuführen waren. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 2‰

Dichlorphenolindophenol (DCIP) zugefügt, gefolgt von entsprechenden Konzentrationen der angegebenen Substanzen. Die aktive Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) katalysiert die Reaktion vom Succinat zum Fumarat, in deren Folge ein Elektronentransfer auf das Ubiquinon stattfindet. Dieses reduzierte Ubiquinon wird durch DCIP reoxidiert, welches bei dieser Reaktion reduziert wird. Der Anteil an reduziertem DCIP repräsentiert die Aktivität des Komplexes II und kann bei 610 nm mit der Referenz bei 750 nm mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu Multi Spec-1501 diode array spectrophotometer, Shimadzu Europe GmbH, Duisburg) nachgewiesen werden.

3.19 Nachweis der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Intrazellulär produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurden mit Hilfe der Färbung durch H₂DCF-DA (Molecular Probes, Leiden (Niederlande)) nachgewiesen. Dieser Farbstoff permeiert über die Membran der Zellen und akkumuliert dort aufgrund der durch Esterasen katalysierten Deacetylierung. In Anwesenheit von ROS kommt es zur Oxidation zum fluoreszierenden DCF, welches mit Hilfe des Durchflusszytometers nachgewiesen werden kann.

Hierfür wurden Jurkat T-Zellen mit 10 µM H₂DCF-DA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in frischem RPMI Medium resuspendiert und mit den im Ergebnisteil beschriebenen Substanzen für 2 h inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurde die Fluoreszenz von 10000 Zellen/Probe mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACSCanto) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm bestimmt.

3.20 Bestimmung des relativen ATP-Gehaltes

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes der Jurkat T-Zellen wurde ein kommerzielles Luziferin-Luziferase Kit verwendet (ATP Bioluminescent Assay Kit, Sigma). Hierfür wurden 5 x 10⁵ Jurkat T-Zellen 2 h nach entsprechenden Stimuli in 100 µl Reporter-Lysepuffer resuspendiert, schockgefroren und bei -80 °C über Nacht gelagert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und 15 min geschüttelt (750 U/min). Durch einen Zentrifugationsschritt von 2 min bei 12000 x g und Raumtemperatur wurden die lysierten Zellfragmente pelletiert. Die Messung des im Überstand vorhandenen ATPs erfolgte entsprechend der Beschreibung des Herstellers. Hierbei führt das zu messende ATP zur Luziferase-katalysierten Chemilumineszenzreaktion, welche mit Hilfe des Luminometers nachgewiesen werden konnte. Die ATP-Konzentration wurde anhand eines dem Kit beigelegten Standards quantifiziert. Zur Vergleichbarkeit der ermittelten ATP-

Konzentrationen wurde von den Überständen zusätzlich die Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (3.14.1) bestimmt und der relative ATP-Gehalt jeder Probe berechnet. Hierbei wurde der relative ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen als 100% definiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Nachweis der PPAR γ abhängigen Apoptose von T-Zellen im pathophysiologischen Verlauf der Sepsis

4.1.1 Identifizierung der Leukozytenverteilung im peripheren Blut von Sepsis-Patienten

Um zu überprüfen, ob die pro-apoptotische Wirkung von PPAR γ in T-Zellen prinzipiell an der Lymphopenie während der Sepsis beteiligt ist, musste diese zunächst als Grundvoraussetzung in den von mir gesammelten Blutproben von Sepsis-Patienten bestätigt werden. Hierfür wurde die Leukozytenverteilung (durchschnittliche Zellzahl der entsprechenden Populationen \pm S.D. pro μ l Blut) nach Erythrozytenlyse (3.3.2) in peripherem Blut von gesunden Spendern und von Sepsis-Patienten mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt und anschließend verglichen (Tab. 1). Im Blut der Sepsis-Patienten konnte eine signifikante Erhöhung der Gesamt-Leukozytenzahl (Tab. 1, Leukozyten 13419 ± 4931) verglichen mit der Anzahl in gesunden Spendern (Tab. 1, Leukozyten Kontroll-Spender: 6851 ± 3091) nachgewiesen werden, welche hauptsächlich auf das vermehrte Vorkommen von Granulozyten (CD66b⁺) zurückzuführen war (Tab. 1, Granulozyten Sepsis-Patienten: 10801 ± 3783 im Vergleich zu Granulozyten Kontroll-Spender: 4566 ± 2415). Dahingegen war kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Monozyten (CD14⁺CD66b⁻) zu verzeichnen (Tab. 1, Monozyten Sepsis-Patienten: 529 ± 264 im Vergleich zu Monozyten Kontroll-Spender: 398 ± 142). Die Zahl der Lymphozyten insgesamt war im Blut der Sepsis-Patienten mit 1042 ± 733 (Tab. 1, Sepsis-Patienten Lymphozyten) im Vergleich zu den Kontroll-Spendern mit 1615 ± 443 (Tab. 1, Kontroll-Spender Lymphozyten) signifikant erniedrigt. Dies deutete darauf hin, dass eine Lymphopenie vorlag. Innerhalb der Lymphozytenpopulation konnte ich keinen Unterschied bei der Anzahl der B-Zellen (CD19⁺) feststellen (Tab. 1, B-Zellen Kontroll-Spender: 117 ± 41 im Vergleich zu B-Zellen Sepsis-Patienten: 115 ± 58), jedoch war die Anzahl der T-Zellen (CD3⁺) im Blut septischer Patienten (Tab. 1, Sepsis-Patienten T-Zellen: 761 ± 486) signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontroll-Spendern (Tab. 1, Kontroll-Spender T-Zellen: 1265 ± 268). Aufgrund des besonderen Interesses für T-Zellen wurde zusätzlich untersucht, ob die CD3⁺CD4⁺, d. h. T-Helferzellen gleichermaßen betroffen waren wie die CD3⁺CD8⁺, d. h. cytotoxischen T-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die T-Helferzellen im Blut von Sepsis-Patienten signifikant depletiert waren (Tab. 1, CD3⁺CD4⁺ Sepsis-Patienten 457 ± 265 verglichen mit CD3⁺CD4⁺

Kontroll-Spender: 818 ± 286), wohingegen bei den cytotoxischen T-Zellen kein signifikanter Unterschied nachweisbar war (Tab. 1, $CD3^+CD8^+$ Sepsis-Patienten: 306 ± 396 im Vergleich zu $CD3^+CD8^+$ Kontroll-Spender: 367 ± 186). Aus diesem Grund war auch das Verhältnis der T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) zu den cytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$) von $2,2 \pm 1,5$ in den Kontroll-Spendern auf $1,5 \pm 0,7$ in den Sepsis-Patienten reduziert (Tab. 1, $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ -Verhältnis).

Tab. 1: Leukozytenverteilung in peripherem Blut von Kontroll-Spendern im Vergleich zu Sepsis-Patienten. Angegeben sind Mittelwerte aus $n = 7 \pm S.D.$

Zelltypen	Kontroll-Spender (n = 7)	Sepsis-Patienten (n = 7)	Signifikanz- niveau <i>p</i>
Leukozyten (pro μ l)	6851 (\pm 3091)	13419 (\pm 4931)	<0,05
Granulozyten $CD66b^+$ (pro μ l)	4565,7 (\pm 2415)	10801 (\pm 3783)	<0,005
Monozyten $CD14^+CD66b^-$ (pro μ l)	397,5 (\pm 142)	528,5 (\pm 264)	
Lymphozyten (pro μ l)	1615 (\pm 443)	1042 (\pm 733)	<0,005
T-Zellen $CD3^+$ (pro μ l)	1265 (\pm 268)	761 (\pm 486)	<0,05
$CD3^+CD4^+$ (pro μ l)	818 (\pm 286)	457 (\pm 265)	<0,005
$CD3^+CD8^+$ (pro μ l)	367 (\pm 186)	306 (\pm 396)	
$CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ -Verhältnis	2,2 (\pm 1,5)	1,5 (\pm 0,7)	
B-Zellen $CD19^+$ (pro μ l)	117 (\pm 41)	115 (\pm 58)	

Die Analyse der absoluten Zellzahlen in den Blutproben (Tab. 1) zeigte im Wesentlichen, dass sowohl das Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten, als auch das Verhältnis von T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) zu cytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$) im peripheren Blut von Sepsis-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern deutlich reduziert war. Dies konnte auch bei der FSC-SSC (‘forward-side-scatter’)-Analyse nach der Dichtegradientenzentrifugation, bei der die Granulozyten depletiert wurden, bestätigt werden (Abb. 9). Das Verhältnis der im Definitionsbereich R2 liegenden Lymphozyten zu den im Definitionsbereich R1 liegenden Monozyten lag bei gesunden Spendern bei ca. 4:1 (Abb. 9A, R2:R1), welches bei Sepsis-Patienten auf ca. 2:1 reduziert war (Abb. 9B, R2:R1). Durch Färbung der im Definitionsbereich R2 liegenden Lymphozyten mit α -CD4- und α -CD8-Fluoreszenz-markierten Antikörpern, konnte ebenso die Verringerung des Verhältnisses T-Helferzellen zu cytotoxischen T-Zellen in Sepsis-Patienten (Abb. 9B, CD4-FITC

20,38% : CD8-PE 37,22% , entspricht ca. 1:2) im Vergleich zu den gesunden Spendern (Abb. 9A, CD4-FITC 40,55% : CD8-PE 19,03%, entspricht ca. 2:1) bestätigt werden.

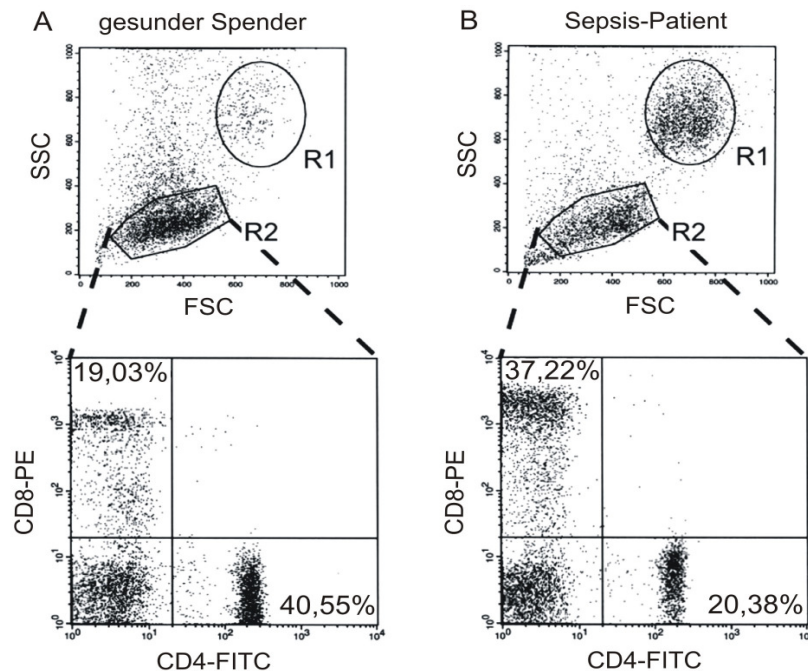


Abb. 9: Analyse der Leukozytenpopulationen in peripherem Blut von Sepsis-Patienten und gesunden Spendern. Durch die Dichtegradientenzentrifugation (siehe Methoden 3.3.1), bei der die Granulozyten depletiert wurden, erfolgte die Aufreinigung der Leukozyten aus dem Vollblut von (A) gesunden Spendern sowie (B) Sepsis-Patienten. Anschließend wurden diese Zellen mit α -CD4-FITC und α -CD8-PE Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert, wobei die Lymphozytenpopulation (R2) und die Monozytenpopulation (R1) anhand der FSC/SSC-Verteilung unterschieden wurden. Mit Hilfe der Angaben durch die BD Cell Quest Pro-Software konnte das Verhältnis R2:R1 berechnet werden (A gesunder Spender R2:R1 = 4:1, B Sepsis-Patient R2:R1 = 2:1). Durch ‚Gaten‘ auf R2 (die unteren Histogramme in der Abbildung) konnten die Anteile der CD4- und CD8-positiven Zellen in der Lymphozytenpopulation der gesunden Spender und der Sepsis-Patienten bestimmt und das Verhältnis CD4:CD8 berechnet werden.

Somit lag in den gesammelten Blutproben von Sepsis-Patienten eine Lymphopenie vor (Tab. 1), welche hauptsächlich auf die Depletion vor allem der CD4⁺ T-Helferzellen zurückzuführen war (Tab. 1 und Abb. 9).

4.1.2 Die Expression von PPAR γ in T-Zellen aus peripherem Blut septischer Patienten

Es wird vermutet, dass die bei der Sepsis auftretende Lymphopenie hauptsächlich auf Apoptose zurückzuführen ist, wobei die dafür verantwortlichen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [96, 100, 114]. Es konnte gezeigt werden, dass PPAR γ einen potentiellen Induktor der Apoptose in aktivierten T-Zellen darstellt [26, 65, 66]. Aus diesem

Grund habe ich dessen Rolle bei der Sepsis-induzierten Lymphopenie näher untersucht. Zunächst überprüfte ich die Expression von PPAR γ in T-Zellen septischer Patienten. Hierfür wurden die T-Zellen aus dem peripheren Blut von Sepsis-Patienten und gesunden Spendern mittels positiver Selektion isoliert und die mRNA extrahiert. Mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR siehe 3.5.4) wurde die mRNA-Expression von PPAR γ quantifiziert, wobei eine ca. 12-fach erhöhte Expression in T-Zellen septischer Patienten verglichen mit T-Zellen aus gesunden Spendern festgestellt werden konnte (Abb. 10).

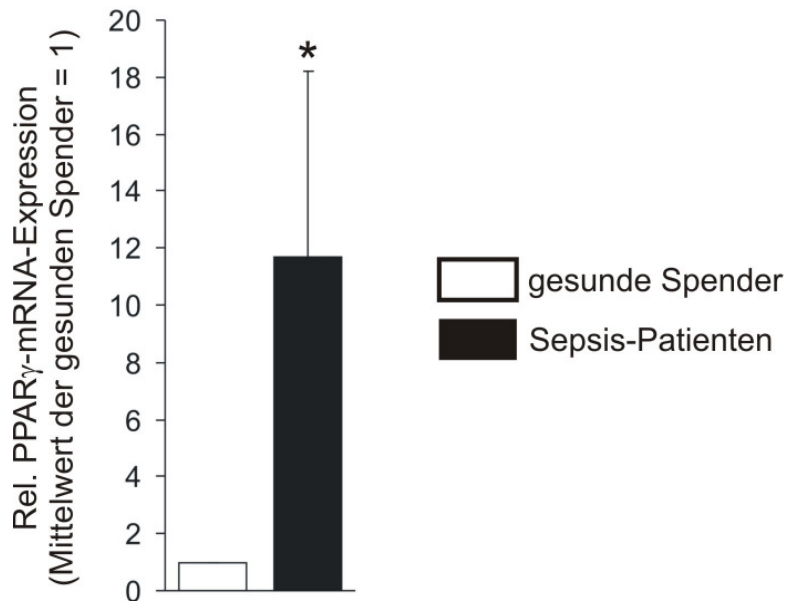


Abb. 10: Die mRNA-Expression von PPAR γ in T-Zellen septischer Patienten und in gesunden Spendern. Die T-Zellen wurden, wie in Methoden (3.3.1) beschrieben, aus dem Vollblut isoliert. Die relative PPAR γ -mRNA-Expression in den T-Zellen gesunder Spender (weißer Balken, n = 7) und septischer Patienten (schwarzer Balken, n = 7) erfolgte mit Hilfe der quantitativen PCR (siehe 3.5.4). Die Experimente wurden dreimal in Triplikaten wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. der rel. PPAR γ -mRNA-Expression, wobei der Mittelwert der gesunden Spender als 1 definiert wurde. *, $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den gesunden Spendern.

Somit lag in den T-Zellen septischer Patienten eine stark erhöhte mRNA-Expression von PPAR γ vor, welches daher als pro-apoptotischer Faktor zur Depletion der T-Zellen und damit zur Lymphopenie während der Sepsis beitragen könnte.

Jedoch reicht die nachgewiesene erhöhte PPAR γ -Expression in den T-Zellen septischer Patienten alleine noch nicht zur Apoptose-Induktion aus. PPAR γ muss, wie in 1.2.5.3 beschrieben, durch einen Liganden aktiviert werden, welcher von T-Zellen jedoch nicht selbst gebildet wird. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob in den T-Zellen septischer Patienten mit erhöhter PPAR γ -mRNA-Expression nach der exogenen Zugabe von PPAR γ -Liganden PPAR γ -vermittelte Apoptose induziert wird [26].

4.1.3 Nachweis der Sensitivierung septischer T-Zellen gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose

Isolierte T-Zellen aus septischen Patienten und aus gesunden Spendern wurden mit dem spezifischen PPAR γ -Liganden Ciglitazon, mit dessen Hilfe die PPAR γ -vermittelte Apoptose in T-Zellen bereits nachgewiesen wurde [26, 65], inkubiert. Weiterhin erfolgte die Inkubation mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle und mit dem PPAR α -Liganden WY14643. PPAR α wird ebenfalls in T-Zellen exprimiert [70] und bindet nach Aktivierung wie PPAR γ an das PPRE. Durch diese Stimuli sollte zusätzlich die PPAR γ -Spezifität des Apoptose-Assays gewährleistet werden (Abb. 11).

Die Inkubation der T-Zellen gesunder Spender führte anhand der DiOC₆(3)-Messung weder mit 10 μ M Ciglitazon (Abb. 11A, weißer Balken 2), noch mit 10 μ M WY14643 (Abb. 11A, weißer Balken 3) oder mit DMSO (Abb. 11A, weißer Balken 4) zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltodes nach 4 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 11A, weißer Balken 1). Dahingegen zeigte sich bei der Inkubation der T-Zellen septischer Patienten, die eine stark erhöhte PPAR γ -Expression aufwiesen (Abb. 10), eine deutliche Induktion des Zelltodes nach der Ciglitazon-Inkubation mit $26 \pm 5,6\%$ DiOC₆(3)-negativen, d. h. toten Zellen (Abb. 11A, schwarzer Balken 2) im Vergleich zu $11 \pm 2,4\%$ bei der unbehandelten Kontrolle (Abb. 11A, schwarzer Balken 1). Die Stimulation mit DMSO (Abb. 11A, schwarzer Balken 4) bzw. WY14643 (Abb. 11A, schwarzer Balken 3) führte zu keinem nachweisbaren Zelltod, wodurch die PPAR γ -Spezifität des beobachteten Effektes unterstützt wird.

Durch das Annexin V-FITC/PI-Assay sollte überprüft werden, ob Apoptose als verantwortlicher Mechanismus für den durch DiOC₆(3)-Färbung ermittelten Zelltod nach Ciglitazon-Inkubation in septischen T-Zellen (Abb. 11A, schwarzer Balken 2) erfolgte (Abb. 11B-E). Hierbei bestätigte sich, dass die Inkubation der T-Zellen gesunder Spender mit Ciglitazon (Abb. 11C, 4,84% apoptotisch und 9,16% sekundär nekrotisch) keine signifikante Induktion der Apoptose gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 11B, 7,75% apoptotisch und 3,35% sekundär nekrotisch) hervorrief. Dahingegen induzierte die Ciglitazon-Inkubation von T-Zellen septischer Patienten signifikant Apoptose, welche anhand der 18,01% Annexin V-FITC-positiven, d. h. apoptotischen Zellen (Abb. 11E) im Vergleich zu den 5,25% Annexin V-FITC-positiven Zellen in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 11D) deutlich wurde. Es konnte keine signifikante Erhöhung der Annexin V-FITC/PI-positiven Zellen in Ciglitazon-stimulierten septischen T-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle identifiziert werden, weshalb Nekrose als Ursache für den

beobachteten Zelltod ausgeschlossen werden konnte (Abb. 11D, 7,16% vs. Abb. 11E, 10,1%).

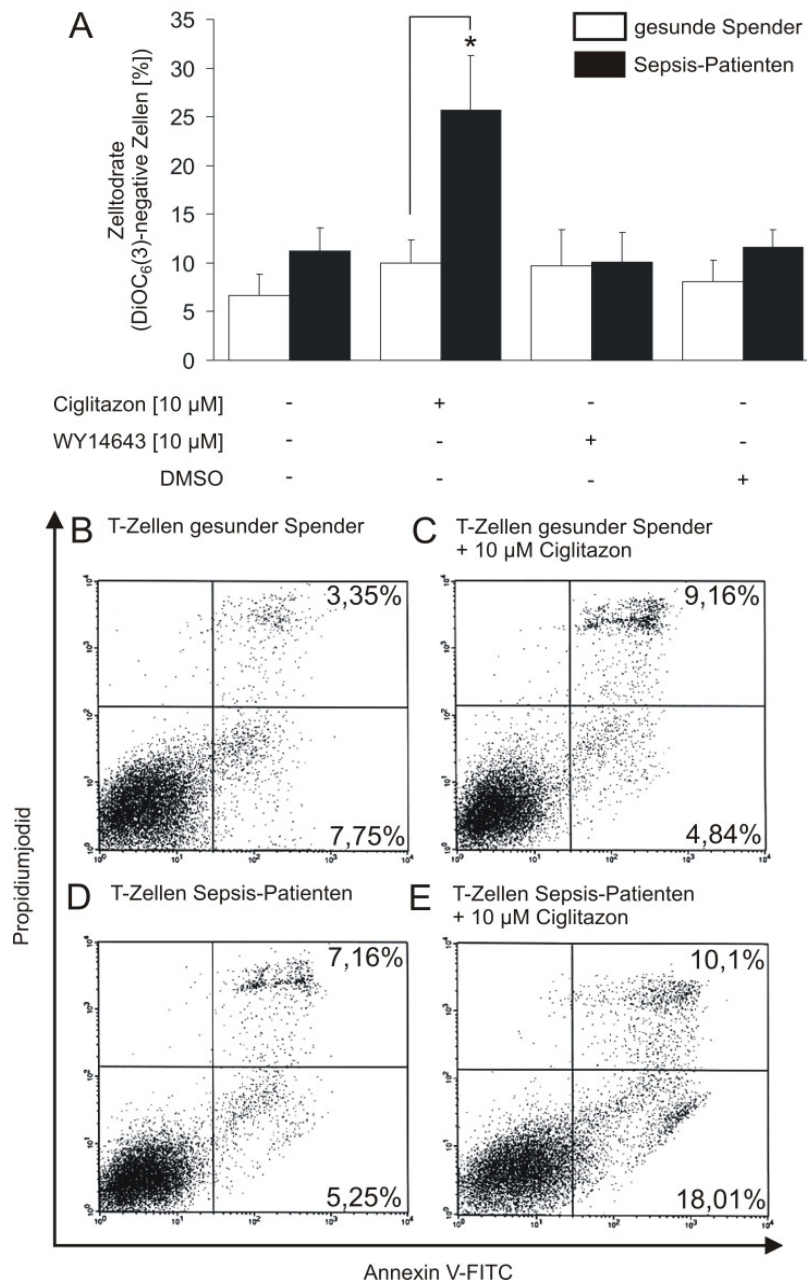


Abb. 11: PPAR γ -vermittelte Apoptose in T-Zellen septischer Patienten. (A) Die T-Zellen gesunder Spender (weiße Balken, n = 10) und von Sepsis-Patienten (schwarze Balken, n = 15) wurden mit 10 μ M Ciglitazon, 10 μ M WY14643 oder entsprechendem Volumen DMSO für 4 h inkubiert. Die Zelltodrate wurde mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung (3.13.1) bestimmt. Es sind die Mittelwerte \pm S.D. dargestellt. *, $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. (B-E) Das Annexin V-FITC/PI-Assay wurde, wie in 3.13.2 beschrieben, durchgeführt. T-Zellen septischer Patienten (D, E) oder gesunder Spender (B, C) wurden für 4 h mit 10 μ M Ciglitazon inkubiert (C, E) bzw. blieben unstimuliert (B, D). Dargestellt sind repräsentative Daten von gesunden Spendern (n = 8) und Sepsis-Patienten (n = 8).

Die T-Zellen septischer Patienten wiesen somit eine höhere PPAR γ -mRNA-Expression auf und *in vitro* wurde durch die Zugabe von PPAR γ -Liganden PPAR γ -vermittelte Apoptose induziert. Falls die PPAR γ -vermittelte Apoptose an der im peripheren Blut des Patienten zum Zeitpunkt der T-Zellisolation bereits stattgefundenen Lymphopenie beteiligt war, muss *in vivo* ein potentieller PPAR γ -Ligand vorgelegen haben. Dies sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

4.1.4 Identifizierung von potentiellen PPAR γ -Liganden im Plasma von Sepsis-Patienten

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Jurkat T-Zellen als Testsystem gewählt, da sie relativ einfach zu transfizieren waren. Die Identifikation der PPAR-Aktivierung erfolgte durch ein PPRE-enthaltendes Luziferase-Reporter-Plasmid, welches in die Jurkat T-Zellen transfiziert wurde. Zur Erhöhung der Sensitivität und der Spezifität des Systems wurde ein PPAR γ -Wildtyp-Plasmid bzw. ein PPAR γ -dominant-negatives (d/n)-Plasmid cotransfiziert. So transfizierte Zellen wurden für 6 h mit den Plasmen der Sepsis-Patienten oder der gesunden Spender inkubiert und anschließend die Reporter-Analyse durchgeführt (Abb. 12). Bei der Detektion der Luziferase-Aktivität zeigte sich in Jurkat T-Zellen, bei denen das PPAR γ -Wildtyp-Protein überexprimiert wurde, im Vergleich zu den gesunden Spendern (Abb. 12A, weißer Balken) eine 3-fach höhere Aktivierung des PPRE-Luziferase-Reporters durch die Plasmen der Sepsis-Patienten (Abb. 12A, schwarzer Balken). Als Positivkontrolle für das Testsystem wurde der selektive PPAR γ -Ligand Ciglitazon verwendet, welcher eine 6-fache Induktion der Reporteraktivität bewirkte (Abb. 12A, grauer Balken). Diese Daten wiesen darauf hin, dass im Plasma der Sepsis-Patienten ein PPAR-aktivierender Ligand vorlag. Im Folgenden wurde überprüft, ob die durch das Plasma der Sepsis-Patienten induzierte PPRE-Luziferase-Reporter-Aktivierung tatsächlich auf PPAR γ zurückzuführen war. Hierzu wurde in den Jurkat T-Zellen statt des PPAR γ -Wildtyp-Plasmids das PPAR γ -d/n-Plasmid, die so genannte AF2-Mutante transfiziert. In dieser mutierten Form des PPAR γ -Proteins sind zwei Punktmutationen in der AF2-Domäne eingeführt worden (Leu468Ala/Glu471Ala), wodurch die PPAR γ -vermittelte Transaktivierung gehemmt wird [115]. Nach Überexpression dieser PPAR γ -AF2-Mutante konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12B, weiß-kariierter Balken) keine PPRE-Luziferase-Reporter-Aktivierung durch das Plasma der Sepsis-Patienten nachgewiesen werden (Abb. 12B, schwarzer Balken). Auch die in Abb. 12A vorhandene Induktion des Reporters mit dem selektiven PPAR γ -Liganden Ciglitazon (grauer Balken) konnte durch die Überexpression der

PPAR γ -AF2-Mutante vollständig inhibiert werden (Abb. 12B, grauer Balken). Dies bestätigte die PPAR γ -Spezifität des Testsystems.

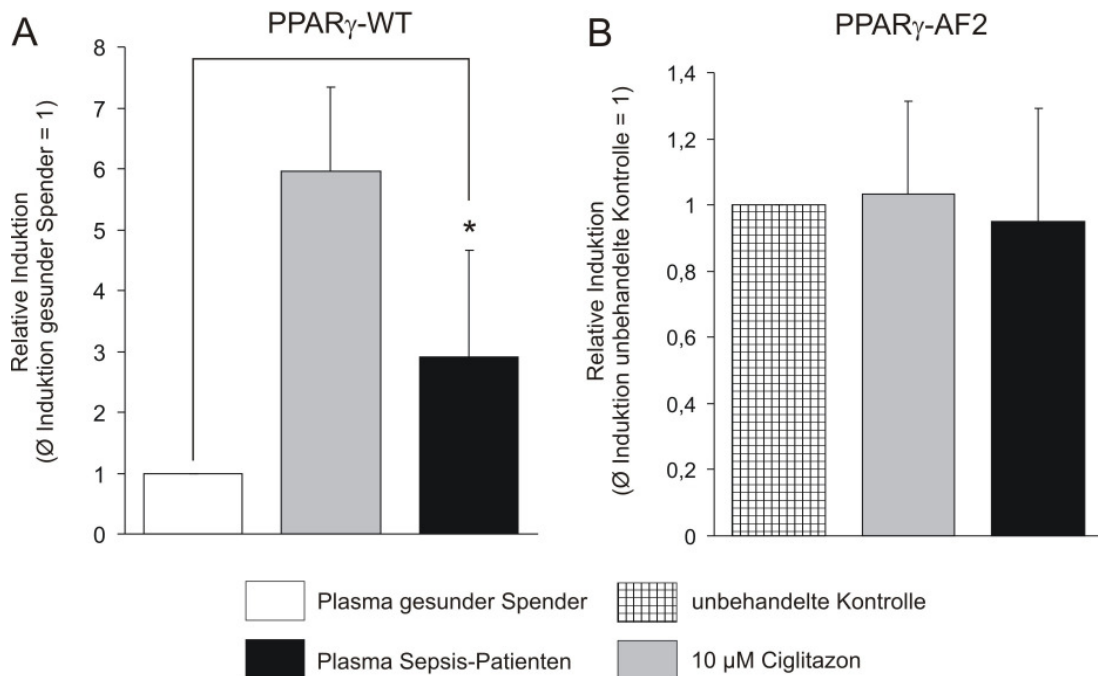


Abb. 12: Plasma von Sepsis-Patienten aktiviert das PPRE in Jurkat T-Zellen, die mit einem PPRE-enthaltenden Luziferase-Reporter-Plasmid [p(AOX)₃-TK-luc] transfiziert wurden (siehe 3.15). (A) 24 h nach Cotransfektion des PPAR γ -WT-Plasmids wurden die Zellen für 6 h mit den Plasmen von Sepsis-Patienten (schwarzer Balken, n = 15) und gesunder Spender (weißer Balken, n = 10) oder mit dem PPAR γ -Liganden Ciglitazon [10 μ M] (grauer Balken, n = 5) als Positiv-Kontrolle, inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde als Vielfaches von der durchschnittlichen Aktivierung des Plasmas gesunder Spender (als 1 definiert) angegeben. Jedes Experiment wurde dreimal mit Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D., $p \leq 0,05$ (*). (B) Die Zellen wurden mit der PPAR γ -d/n (AF2)-Mutante cotransfiziert und für 6 h mit dem Plasma von Sepsis-Patienten (schwarzer Balken, n = 15) bzw. mit dem PPAR γ -Liganden Ciglitazon [10 μ M] (grauer Balken, n = 3) inkubiert oder blieben unstimuliert (weiß-kariertes Balken, n = 3). Die relative Luziferase-Aktivität wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (=1) berechnet. Jedes Experiment wurde dreimal mit Duplikaten durchgeführt. Es sind die Mittelwerte \pm S.D. dargestellt.

Somit konnte durch die Reporter-Analysen eine Aktivierung von PPAR γ durch das Plasma von Sepsis-Patienten nachgewiesen werden, welche auf einen potentiell vorliegenden Liganden hinweist. Zusätzlich sollte nun überprüft werden, ob das PPAR γ -aktivierende Plasma der Sepsis-Patienten auch in der Lage ist, die PPAR γ -vermittelte Apoptose in den T-Zellen zu induzieren. Hierfür wurden wiederum Jurkat T-Zellen mit dem PPAR γ -Wildtyp-Plasmid bzw. mit der PPAR γ -AF2-Mutante transfiziert und anschließend mit den Plasmen

von Sepsis-Patienten sowie gesunder Spender und dem spezifischen PPAR γ -Liganden Ciglitazon für 4 h inkubiert. Mit Hilfe der DiOC $_6$ (3)-Färbung wurde die Zelltodrate nach den entsprechenden Stimulationen bestimmt (Abb. 13).

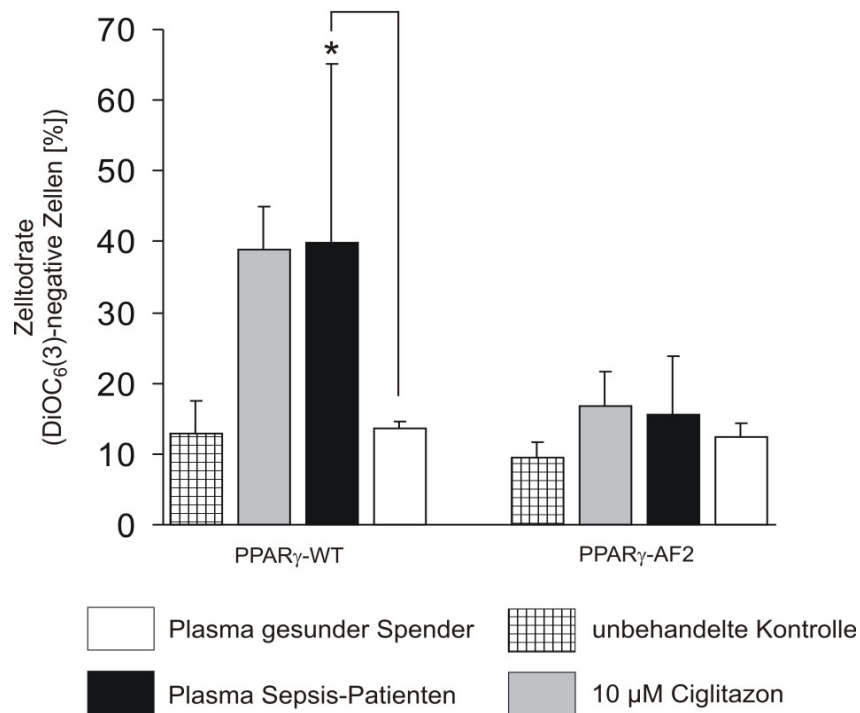


Abb. 13: Das Plasma von Sepsis-Patienten induziert PPAR γ -vermittelte Apoptose in Jurkat T-Zellen, bei denen das PPAR γ -Wildtyp-Protein überexprimiert wurde. Jurkat T-Zellen wurden mit dem PPAR γ -WT-Plasmid (PPAR γ -WT) bzw. der PPAR γ -d/n-Mutante (PPAR γ -AF2) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden so transfizierte Zellen für 4 h mit den Plasmen gesunder Spender (weiße Balken, n = 5) bzw. von Sepsis-Patienten (schwarze Balken, n = 10), sowie dem PPAR γ -Liganden Ciglitazon [10 μ M] (graue Balken, n = 3) inkubiert oder blieben unstimuliert (weiß-karierte Balken, n = 3). Nach der Stimulation wurde die Zelltodrate mit Hilfe der DiOC $_6$ (3)-Färbung (3.13.1) bestimmt. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D., $p \leq 0,05$ (*).

In PPAR γ -Wildtyp-Protein überexprimierenden Jurkat T-Zellen führte die Inkubation mit dem Plasma septischer Patienten zur signifikanten Induktion des Zelltodes (Abb. 13, PPAR γ -WT, schwarzer Balken 39,8 \pm 25,3%), wohingegen das Plasma der gesunden Spender (Abb. 13, PPAR γ -WT, weißer Balken 13,7 \pm 0,8%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 13, PPAR γ -WT, weiß-kariertes Balken 12,9 \pm 4,3%) keine Apoptose induzierte. Diese, durch Inkubation mit dem Plasma von Sepsis-Patienten induzierte Apoptose, konnte durch die Überexpression der PPAR γ -AF2-Mutante deutlich inhibiert werden (Abb. 13, PPAR γ -AF2, schwarzer Balken 15,6 \pm 8,2% im Vergleich zu Abb. 13, PPAR γ -WT, schwarzer

Balken $39,8 \pm 25,3\%$). Dies deutete auf PPAR γ -vermittelte Signalwege hin. Die Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Ciglitazon bewirkte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Induktion des Zelltodes in PPAR γ -Wildtyp-exprimierenden Jurkat Zellen (Abb. 13, PPAR γ -WT, grauer Balken $38,9 \pm 6\%$ verglichen mit weiß-kariertem Balken $12,9 \pm 4,3\%$), welche jedoch in Jurkat Zellen, die die PPAR γ -AF2-Mutante überexprimierten, nicht mehr nachweisbar war (Abb. 13, PPAR γ -WT, grauer Balken $38,9 \pm 6\%$ im Vergleich zu Abb. 13, PPAR γ -AF2, grauer Balken $16,7 \pm 5\%$).

In vitro konnte ich somit nachweisen, dass das Plasma von Sepsis-Patienten in der Lage war PPAR γ zu aktivieren (Abb. 12) und damit zur Induktion der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-Zellen führen konnte (Abb. 13). Zusammen mit der Identifikation einer stark erhöhten PPAR γ -mRNA-Expression in den T-Zellen, die aus dem peripheren Blut von Sepsis-Patienten isoliert wurden (Abb. 10) und *in vitro* sensitiv gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose waren, wird die Hypothese bestätigt, dass die PPAR γ -vermittelte Apoptose in T-Zellen zur Lymphopenie während der Sepsis beitragen kann.

Jedoch konnten mit diesem Modell lediglich Korrelationen aufgezeigt werden, denn die Lymphopenie hatte zum Zeitpunkt der Isolation der Zellen aus dem peripheren Blut bereits stattgefunden. Aus diesem Grund ist die Überprüfung der Hypothese im Maus-Modell unumgänglich.

4.1.5 Etablierung eines Maus-Modells zur Klärung der Rolle von PPAR γ bei der Sepsis-induzierten T-Zelledepletion

Zur Klärung der Rolle von PPAR γ bei der T-Zell-Apoptose während der Sepsis, sollte ein Maus-Modell etabliert werden, bei dem PPAR γ in den T-Zellen deletiert ist. Die komplette Deletion von PPAR γ ist in Mäusen nicht möglich, da sich bei diesen Tieren diese Deletion während der Embryogenese letal auswirkt [116]. Aus diesem Grund sollen konditionelle PPAR γ -knock-out-Mäuse gezüchtet werden, bei denen PPAR γ möglichst nur in T-Zellen deletiert ist. Falls PPAR γ in T-Zellen zur Sepsis-induzierten Lymphopenie beiträgt, sollte in diesen konditionellen PPAR γ -knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte Lymphopenie infolge einer Sepsis-Induktion (CLP oder LPS-Injektion) auftreten.

Zur spezifischen Deletion von PPAR γ mussten zunächst Mäuse, bei denen das Exon 2 des PPAR γ -Gens auf beiden Allelen von loxP-sites flankiert ist (PPAR $\gamma^{\text{fl/fl}}$), mit Mäusen gekreuzt

werden, bei denen die Expression der für die Deletion zuständigen Cre unter Kontrolle des entsprechend gewebespezifischen Promotors ist. Hierfür stand die lck-Cre-Maus zur Verfügung, bei der die Cre-Expression vom T-Zell-spezifischen lck-Promotor gesteuert wird [117]. Die konditionelle PPAR γ -knock-out-Maus: lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$, wurde durch die in Abb. 14 dargestellten Verpaarungen gezüchtet:

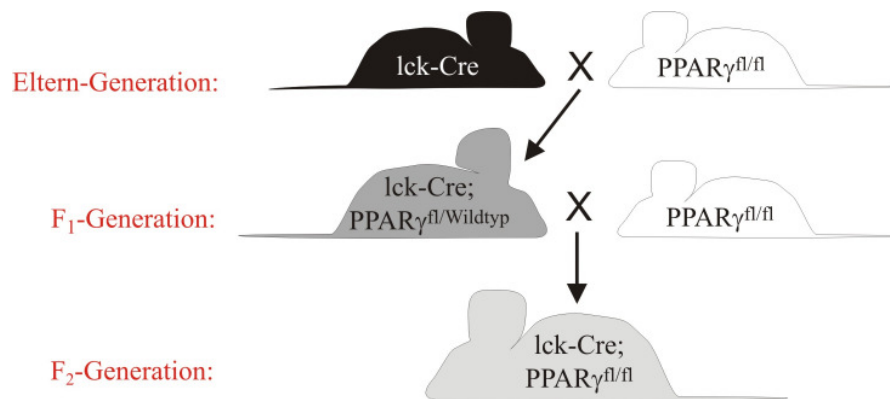


Abb. 14: Verpaarungsschema zur Zucht von lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen als konditionelle PPAR γ -knock-out-Mäuse. Vorhandene homozygote lck-Cre-Mäuse wurden mit homozygoten PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen verpaart (Eltern-Generation). Die in der F₁-Generation entstandenen Tiere sind heterozygot hinsichtlich des lck-Cre-Allels als auch des loxP-flankierten Exon 2 des PPAR γ -Allels und werden als lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/Wildtyp}$ -Mäuse bezeichnet. Die Nachkommen der F₁-Generation wurden wiederum mit homozygoten PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen verpaart. In der daraus entstandenen F₂-Generation wurde mittels PCR (3.6) nach Tieren gesucht, die ein lck-Cre-Allel besitzen und homozygot hinsichtlich des loxP-flankierten Exon 2 des PPAR γ -Allels sind. Diese entsprechen dem Genotyp lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ und wurden für die Weiterzucht bzw. die weiteren Experimente verwendet.

Für die Genotypisierung der Tiere wurde, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, die genomische DNA aus den Ohrstücken extrahiert und anschließend mittels PCR der jeweilige Genotyp bestimmt. Bei der PCR zur Detektion von loxP-flankiertem PPAR γ zeigte sich bei der Maus in Bahn 1 ein Produkt mit 275 bp, d. h. bei diesem Tier sind die Exons 2 beider PPAR γ -Allele von loxP-sites flankiert (Abb. 15, Maus 1, PPAR γ^{fl} -Bande). Zudem konnte ein 500 bp Produkt bei der Detektion der lck-Promotor-gesteuerten Cre nachgewiesen werden (Abb. 15, Maus 1, lck-Cre-Bande). Somit handelte es sich bei der Maus 1 um den gewünschten Genotyp lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$. Bei der Maus 2 liegt der Genotyp PPAR $\gamma^{fl/Wildtyp}$ vor, da keine lck-Cre-Bande, jedoch eine PPAR γ^{fl} -Bande mit 275 bp sowie eine PPAR $\gamma^{Wildtyp}$ -Bande mit 225 bp nachweisbar war (Abb. 15, Maus 2, PPAR γ^{fl} -Bande und PPAR $\gamma^{Wildtyp}$ -Bande). Diese PPAR $\gamma^{Wildtyp}$ -Bande mit 225 bp entsteht, wenn das PPAR γ -Allel nicht von loxP-sites flankiert

ist, wie es erwartungsgemäß bei der Wildtyp-Maus in Bahn 3 der Fall (Abb. 15, Bahn 3 PPAR γ^{Wildtyp} -Bande) war.

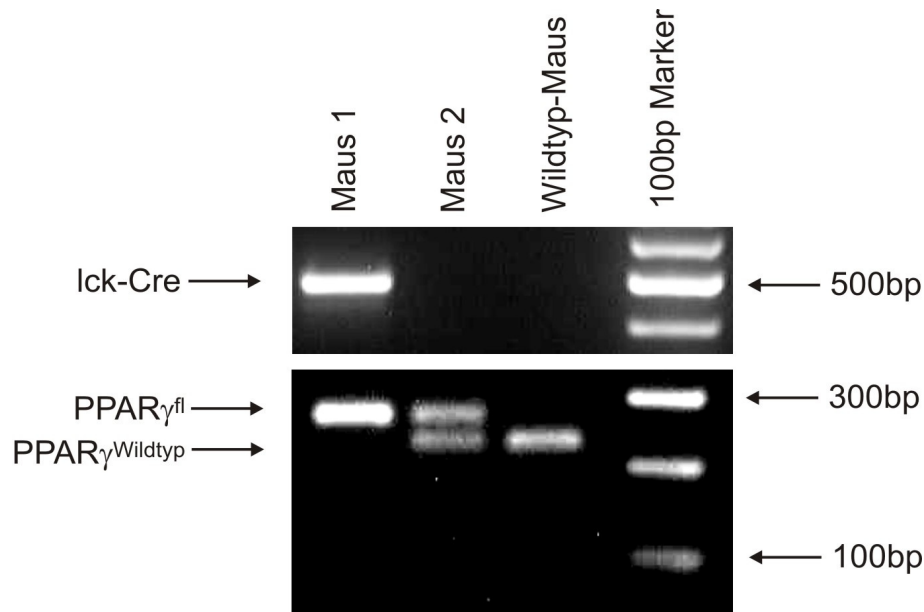


Abb. 15: Genotypisierung der gewünschten lck-Cre;PPAR $\gamma^{\text{fl/fl}}$ -Maus mittels PCR. Die Genotypisierung mittels PCR erfolgte wie in Methoden (3.6) beschrieben, mit 35 Zyklen und anschließender Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel. Die Maus 1 (Bahn 1) weist ein ca. 500 bp PCR-Produkt mit der Primerkombination zur Detektion von lck-Cre (2.6) sowie ein einzelnes Produkt bei der Primerkombination zur Detektion des loxP-flankierten Exon 2 des PPAR γ -Allels bzw. Wildtyp-PPAR γ -Allels auf. D. h. bei Maus 1 liegt der Genotyp lck-Cre;PPAR $\gamma^{\text{fl/fl}}$ vor. Bei der Maus 2 (Bahn 2) entstand kein lck-Cre PCR-Produkt, jedoch zwei Produkte mit 275 und 225 bp mit der Primerkombination zur Detektion des loxP-flankierten bzw. Wildtyp-PPAR γ -Allels, d. h. der Genotyp PPAR $\gamma^{\text{fl/Wildtyp}}$ liegt vor. Bei der Wildtyp-Maus (Bahn 3) war erwartungsgemäß kein PCR-Produkt bei der Detektion von lck-Cre vorhanden und ausschließlich ein 225 bp PCR-Produkt, welches auf die PPAR γ -Wildtyp-Allele zurückzuführen ist. In Bahn 4 wurde ein 100 bp Marker zur Größenbestimmung der PCR-Produkte aufgetragen.

Nachdem nun Mäuse mit dem korrekten Genotyp vorhanden waren, musste weiterhin überprüft werden, ob die Cre-vermittelte Deletion des Exons 2 von PPAR γ in den T-Zellen der lck-Cre;PPAR $\gamma^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse erfolgreich war (Abb. 16). Hierzu wurden die T-Zellen mittels negativer Selektion (Pan T cell isolation kit, BD Biosciences, Heidelberg) aus der Milz der Mäuse isoliert (3.4.1) und anschließend die genomische DNA (DNA-Isolationskit: Genomic DNA Buffer Set und Genomic-tip 20/G, Qiagen GmbH, Hilden) extrahiert. Die Überprüfung der Deletionseffizienz des Exons 2 von PPAR γ erfolgte wiederum mittels PCR-Analyse. Hierzu diente die Primerkombination GT-PPAR γ_{F} und GT-PPAR γ_{R2} (2.6) bei der ein 400 bp Produkt entstand (im Folgenden als Deletionsbande bezeichnet), sofern das Exon 2 im

PPAR γ -Gen durch die Cre-Reaktion deletiert wurde (siehe 2.6). Falls das Exon 2 von PPAR γ nicht deletiert ist, wird ein Produkt mit 275 bp durch die Primerkombination GT-PPAR γ _F und GT-PPAR γ _R1 (2.6) amplifiziert (im Folgenden als loxP-Bande bezeichnet).

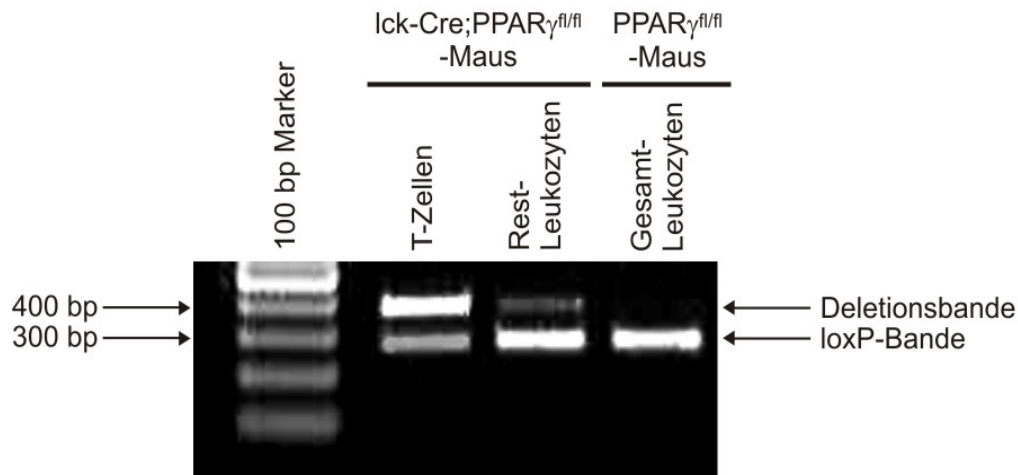


Abb. 16: Überprüfung der Deletion in den lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen. Aus den Milzen der lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäuse sowie der PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäuse wurden die Gesamt-Leukozyten bzw. T-Zellen, wie in Methoden 3.4.2 beschrieben, isoliert. Nach Extraktion der genomischen DNA (siehe Methoden 3.4.2), wurde mittels PCR (Methoden 3.6) die Deletionsbande (Primerkombination PPAR γ _F und PPAR γ _R2 (2.6)) bzw. die loxP-Bande (Primerkombination PPAR γ _F und PPAR γ _R1 (2.6)), in der negativen Fraktion (T-Zellen, Bahn 2) sowie der positiven Fraktion (Rest-Leukozyten, Bahn 3) der lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäuse und in den Gesamt-Leukozyten der PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäuse (Bahn 4) nachgewiesen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1,5%-igen Agarosegel getrennt (siehe Methoden 3.8) und ein 100 bp Marker zum Größenvergleich aufgetragen (Bahn 1).

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, zeigte sich bei den Gesamt-Leukozyten von PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen erwartungsgemäß ausschließlich die loxP-Bande (275 bp), da diese Mäuse keine Cre exprimieren und somit auch keine Deletion stattfinden konnte (Abb. 16, Bahn 4). Durch die lck-kontrollierte Expression der Cre ist deren Expression spezifisch in den T-Zellen zu erwarten, welche zur Deletion des Exons 2 des PPAR γ -Gens in den T-Zellen führen sollte. Den Erwartungen entsprechend konnte mittels PCR bei den T-Zellen, die aus lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen isoliert wurden, eine Deletionsbande als auch eine loxP-Bande identifiziert werden. Hierbei war jedoch die Intensität der Deletionsbande deutlich stärker, als die der loxP-Bande (Abb. 16, Bahn 2). Eine 100%-ige Deletion, d. h. ein Fehlen der loxP-Bande wurde auch nicht erwartet, da die Aufreinigung der T-Zellen durchschnittlich ca. 90% betrug und somit 10% an Zellen vorhanden waren, bei denen die Cre-Reaktion nicht stattfand, da diese durch den lck-Promotor T-Zell-spezifisch war. Der umgekehrte Fall ist bei

der Rest-Leukozyten-Population, aus der die T-Zellen isoliert wurden, zu sehen. In dieser Population sind aufgrund der Aufreinigungsmethode nicht-selektionierte T-Zellen zu erwarten, wodurch die Deletionsbande und die loxP-Bande detektiert werden konnten (Abb. 16, Bahn 3). Allerdings ist hier die Intensität der loxP-Bande deutlich höher als die der Deletionsbande.

Anhand der PCR-Analysen zur Überprüfung der Deletion des Exons 2 des PPAR γ -Gens ist eine eindeutige Aussage über die Deletionseffizienz zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Aufgrund der erfolgreich nachgewiesenen Deletionsbande, die besonders stark in den T-Zellen und nur schwach in der Rest-Leukozyten-Population war (Abb. 16), liegt die Vermutung nahe, dass die Cre-vermittelte Deletionsreaktion prinzipiell stattfand und eine T-Zell-Spezifität aufwies. Die Effizienz der Deletion muss jedoch in weiteren Experimenten durch den Nachweis der PPAR γ -mRNA- bzw. PPAR γ -Protein-Expression in den lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen im Vergleich zu PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen überprüft werden.

Basierend auf den von mir bisher erhobenen Daten, kann man sagen, dass PPAR γ aufgrund seiner anti-inflammatorischen aber auch aufgrund dessen pro-apoptotischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Sepsis spielt. Besonders in der frühen hyper-inflammatorischen Phase wäre eine PPAR γ -Aktivierung von Vorteil, um die systemische inflammatorische Reaktion zu minimieren. Zur PPAR γ -Aktivierung kommen die Thiazolidindione (TZDs) in Frage, die bereits als PPAR γ -Aktivatoren bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ-2 eingesetzt werden. Jedoch konnte ich zeigen, dass die PPAR γ -Aktivierung in T-Zellen, die im peripheren Blut von Sepsis-Patienten zirkulieren, Apoptose induziert. Dies führt vor allem in der späteren hypo-inflammatorischen Phase zur Lymphopenie und damit zur Immunparalyse, wodurch der Erwerb einer Sekundärinfektion begünstigt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass TZDs auch auf PPAR γ -unabhängigen Signalwegen zum Zelltod führen können. Somit sind auch Kenntnisse von TZD-induzierten PPAR γ -unabhängigen Signalwegen die zum Zelltod führen elementar, wenn TZDs als mögliche Therapeutika z. B. bei der Behandlung der Sepsis bzw. von Krebs sowie inflammatorischer und neurodegenerativer Krankheiten [63], neben deren derzeitigem Einsatz bei Diabetes mellitus Typ-2, diskutiert werden. Die TZD-vermittelte, PPAR γ -unabhängige Zelltod-Induktion in T-Zellen war im Fokus meiner weiteren Studien.

4.2 Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione in der T-Zelllinie Jurkat durch PPAR γ -unabhängige Mechanismen

4.2.1 Der Jurkat P⁻ Klon als Testsystem

Zur Analyse cytotoxischer Effekte der TZDs durch PPAR γ -unabhängige Signalwege in T-Zellen wurde zunächst ein geeignetes Testsystem gesucht. Bei der T-Zelllinie Jurkat existieren hinsichtlich der basalen PPAR γ -Expression unterschiedliche Befunde, die von keiner, bis zu deutlich nachweisbarer basaler Expression reichen [26, 66, 68, 75, 118]. Dies weist auf mögliche Unterschiede in verschiedenen Jurkat-Klonen hin. Aus diesem Grund wurden zunächst verfügbare Jurkat-Klone aus unserem und anderen Labors hinsichtlich ihrer basalen PPAR γ -mRNA Expression getestet. Dabei konnten Unterschiede in der basalen Expression bestätigt werden (Abb. 17A). Ein Klon (Klon 4, Abb. 17A) wies allerdings keine PPAR γ -mRNA-Expression im ruhenden Zustand auf, weshalb dieser weiter bezüglich seiner Eignung als Testsystem charakterisiert wurde.

In humanen Ovarkarzinom-Zellen konnte durch die Inkubation mit 30 μ M Ciglitazon nach 6 h eine deutliche PPAR γ -Expression nachgewiesen werden. Die dabei gewählte Konzentration von 30 μ M lag um das 10-fache höher als der EC₅₀-Wert von PPAR γ mit 3 μ M, wodurch TZD-vermittelte, PPAR γ -unabhängige Effekte, eine erhöhte PPAR γ -Expression bewirken könnten [119]. Um dies in meinem Testsystem zu überprüfen, inkubierte ich den Klon 4 ebenfalls mit 30 μ M des TZDs Ciglitazon für die in meiner Studie maximale Inkubationszeit von 4 h und überprüfte anschließend die PPAR γ -mRNA-Expression. Wie aus Abb. 17B ersichtlich, bewirkte die Ciglitazon-Inkubation keine Induktion der PPAR γ -mRNA-Expression (Abb. 17B, Bahn 3). Dahingegen war eine deutliche Induktion nach Aktivierung der Jurkat T-Zellen mit 25 nM TPA für 15 h zu verzeichnen (Abb. 17C, Bahn 2). D. h. dieser Klon ist prinzipiell in der Lage PPAR γ zu exprimieren, jedoch nicht unter den Bedingungen, die in dieser Studie vorlagen (nicht-aktivierte Jurkat mit einem TZD für 4 h inkubiert, vgl. Abb. 17B). Aus diesem Grund eignete sich dieser Jurkat-Klon als Testsystem für die Untersuchung PPAR γ -unabhängiger, cytotoxischer Effekte der TZDs und wird nun im Folgenden als Jurkat P⁻ deklariert.

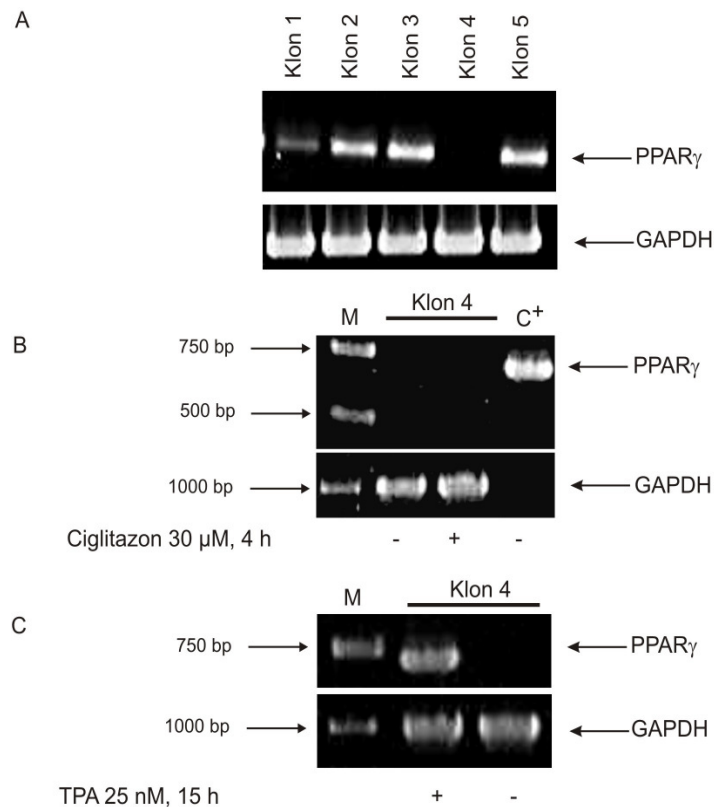


Abb. 17: Analyse der PPAR γ -mRNA-Expression in der T-Zelllinie Jurkat. Die Überprüfung der PPAR γ - und GAPDH-mRNA-Expression erfolgte durch PCR-Analysen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, wie in Methoden (3.5.3 und 3.8) beschrieben. (A) Zur Überprüfung der basalen PPAR γ -mRNA-Expression in verfügbaren Jurkat-Klonen (Klone 1 - 5) wurden diese 24 h in frischem Medium kultiviert und anschließend die mRNA extrahiert sowie die PCR-Analyse durchgeführt. (B) Klon 4 wurde für 4 h mit 30 μ M Ciglitazon inkubiert (Bahn 3) oder blieb unstimuliert (Bahn 2). Nach RNA-Isolation wurde die PCR für PPAR γ und GAPDH durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein PPAR γ -Wildtyp-Plasmid (Bahn 4). Die Größe der PCR-Produkte wurde mit Hilfe eines 1 kb-DNA-Markers (M, Bahn 1) identifiziert. (C) Durch die Stimulation mit 25 nM TPA für 15 h (Bahn 2) wurde der Klon 4 aktiviert oder blieb unbehandelt (Bahn 3). Durch PCR wurde die PPAR γ - und GAPDH-Expression überprüft und anhand des 1kb-DNA-Markers (M, Bahn 1) die Größe der PCR-Produkte kontrolliert.

4.2.2 Charakterisierung der Art des Zelltodes in Jurkat P⁺ Zellen durch Thiazolidindione

Nach Inkubation der Jurkat P⁺ Zellen mit TZDs wurde zunächst das Mitochondrienmembranpotential ($\Delta\Psi_M$) durch die DiOC₆(3)-Färbung (3.13.1) analysiert (Abb. 18). Lebende Zellen besitzen ein intaktes $\Delta\Psi_M$, weshalb sie eine DiOC₆(3)-Färbung aufweisen (DiOC₆(3)-positiv). Ein Zusammenbruch des $\Delta\Psi_M$ ist ein frühes Kennzeichen des Zelltodes und führt dazu, dass die Zellen keine DiOC₆(3)-Färbung mehr aufweisen (DiOC₆(3)-negativ), weshalb sie als tote Zellen definiert werden können. Eine 4-stündige Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen (30 - 100 μ M) an Ciglitazon und

Troglitazon führte zu einer deutlichen Abnahme des $\Delta\Psi_M$. Hierbei induzierte die höchste Konzentration an Ciglitazon (100 μM) in 55% der Zellen den Zelltod (Abb. 18, schwarze Kreise), wohingegen die gleiche Konzentration an Troglitazon in ungefähr 40% der Zellen den Zelltod bewirkte (Abb. 18, weiße Kreise). Somit ist Ciglitazon effektiver als Troglitazon hinsichtlich des Potentials zur Zelltod-Induktion in den Jurkat P⁺ Zellen. Im Gegensatz dazu konnte nach Inkubation mit dem weiteren getesteten TZD Rosiglitazon, bei den eingesetzten Konzentrationen bis zu 100 μM , keine signifikante Induktion des Zelltodes nachgewiesen werden (Abb. 18, schwarze Dreiecke).

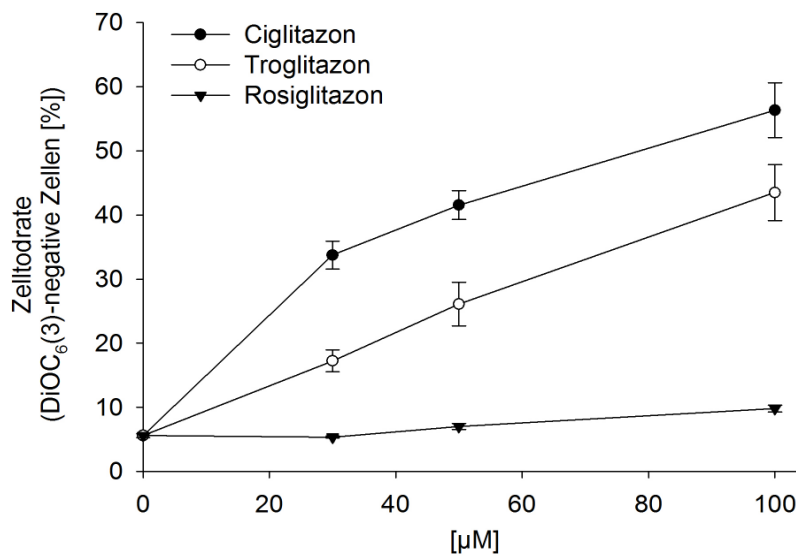


Abb. 18: Die TZD-induzierte Zelltod-Induktion in Jurkat P⁺ Zellen. Jurkat P⁺ Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon von 30 - 100 μM für 4 h inkubiert. Die Messung des Zelltodes erfolgte durch die in Methoden (3.13.1) beschriebene DiOC₆(3)-Färbung mit Hilfe des Durchflusszytometers. Die Zelltodrate wurde als Prozentsatz der DiOC₆(3)-negativen Zellen der Gesamtzellzahl ausgedrückt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E. aus n = 12.

Nun konnte nachgewiesen werden, dass die TZDs Ciglitazon und Troglitazon zu einem schnellen Zusammenbruch des $\Delta\Psi_M$ führen, wodurch jedoch noch keine Aussage über die Art des stattgefundenen Zelltodes (Apoptose vs. Nekrose) getroffen werden kann.

Zur näheren Charakterisierung des Zelltodes wurde ein Annexin V-FITC/PI-Assay (3.13.2) 4 h nach Stimulation mit Ciglitazon, Troglitazon, Rosiglitazon und Staurosporin (STS), einem klassischen Induktor der Apoptose in Jurkat, durchgeführt (Abb. 19A). Die 4-stündige Inkubation der Jurkat P⁺ Zellen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Staurosporin führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Induktion der Apoptose. Hierbei waren im Vergleich zur Kontrolle 75,1% Annexin V-FITC-positiv, d. h. apoptotisch, wogegen 17,2% Annexin V-FITC/PI-positiv,

d. h. sekundär-nekrotisch waren. Die sekundäre Nekrose tritt aufgrund der zunehmenden Permeabilisierung der Zellen auf (Abb. 19A, Kontrolle vs. STS).

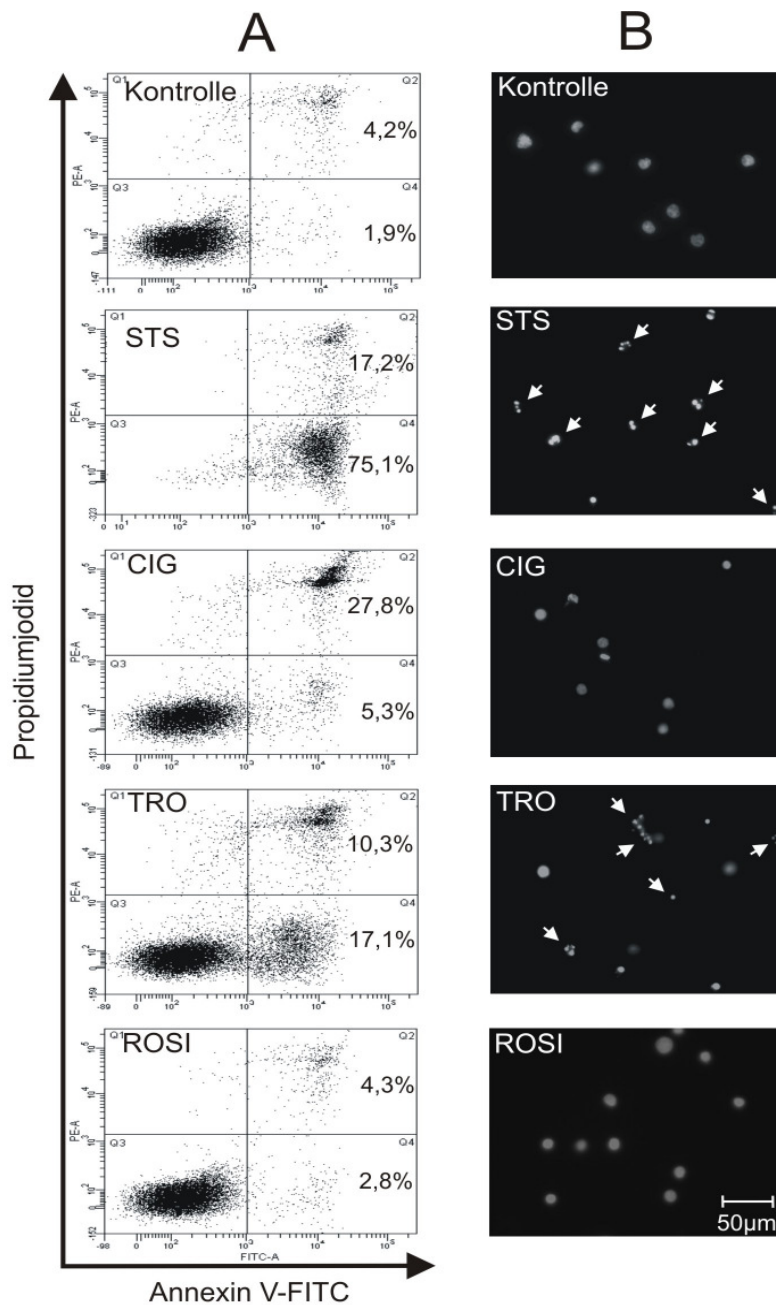


Abb. 19: Charakterisierung des Zelltodes nach Inkubation mit TZDs. Jurkat P⁺ Zellen wurden für 4 h mit 0,5 µg/ml Staurosporin (STS), einem etablierten Apoptose-Induktor, 50 µM Ciglitazon (CIG), 100 µM Troglitazon (TRO), 100 µM Rosiglitazon (ROSI) stimuliert oder blieben unbehandelt (Kontrolle). (A) Nach Ernte der behandelten Zellen wurden sie gewaschen und anschließend ein Annexin V-FITC/PI-Assay, wie in Methoden 3.13.2 beschrieben, zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose durchgeführt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei separaten Experimenten. (B) Die Zellkerne der STS-, CIG-, TRO-, ROSI-behandelten und unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden mit Hilfe der DAPI-Färbung, wie in Methoden 3.13.3 beschrieben, im Fluoreszenz-Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung analysiert. Die weißen Pfeile markieren Zellen mit kondensiertem Chromatin, d. h. apoptotische Zellkerne.

Da Rosiglitazon bei keiner Konzentration das mitochondriale Membranpotential beeinflusste (Abb. 18, schwarze Dreiecke), wurde auch keine Zelltod-Induktion im Annexin V-FITC/PI-Assay erwartet. Diese Erwartung bestätigte sich (Abb. 19A, Rosiglitazon (ROSI) vs. Kontrolle). Die Inkubation mit 100 μ M Troglitazon zeigte, dass die Jurkat P⁺ Zellen vornehmlich aufgrund von Apoptose starben, da im Vergleich zur Kontrolle 17,1% Annexin V-FITC-positiv, also apoptotisch, und lediglich 10,3% Annexin V-FITC/PI-positiv, also sekundär-nekrotisch waren (Abb. 19A, Troglitazon (TRO) vs. Kontrolle). Im Gegensatz dazu konnten nach Inkubation mit Ciglitazon fast ausschließlich Annexin V-FITC/PI-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 19A, Ciglitazon (CIG) 27,8%). Der Anteil an Annexin V-FITC-positiven Zellen, welcher auf Apoptose hinweisen würde, war mit 5,3% im Vergleich zur Kontrolle 1,9% nicht signifikant (Abb. 19A, CIG vs. Kontrolle). Somit führte die Ciglitazon-Inkubation in Jurkat P⁺ Zellen zu einem Zelltod mit eher nekrotischem Charakter, wohingegen Troglitazon in diesen Zellen Apoptose induzierte.

Aufgrund dieser Hinweise wurde im Folgenden mit Hilfe der DAPI-Färbung (3.13.3) überprüft, ob nach der Stimulation apoptotische Zellkerne, die anhand von kondensiertem Chromatin definiert werden können, nachweisbar sind (Abb. 19B). Die Inkubation mit Rosiglitazon wies weder bei der DiOC₆(3)-Färbung noch beim Annexin V-FITC/PI-Assay auf einen Zelltod hin. Dies konnte auch bei der DAPI-Färbung bestätigt werden. Analog zur unbehandelten Kontrolle, war kein kondensiertes Chromatin nachweisbar (Abb. 19B ROSI vs. Kontrolle). In Übereinstimmung mit den Daten aus dem Annexin V-FITC/PI-Assay konnten, nach der Inkubation mit Staurosporin und Troglitazon, Zellkerne mit kondensiertem Chromatin (mit weißen Pfeilen in Abb. 19B markiert) detektiert werden, welche auf apoptotische Signalwege hinwiesen (Abb. 19B, Kontrolle vs. STS oder TRO). Nach der Inkubation mit Ciglitazon konnten dagegen keine apoptotischen Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. 19B, CIG), obwohl ein Zelltod mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung (Abb. 18, schwarze Kreise) und des Annexin V-FITC/PI-Assays (Abb. 19A, CIG) festgestellt wurde. Dies unterstützte somit weiter die Annahme, dass Troglitazon zur Apoptose und Ciglitazon zu einem nekrotischen Zelltod führte.

Zur Bestätigung der Apoptose durch Troglitazon und Nekrose durch Ciglitazon sollte die Apoptose-induzierte Freisetzung des Cytochrom *c* ins Cytosol, als ein weiterer Nachweis zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose dienen (3.13.4). Hierzu wurden Jurkat P⁺ Zellen mit 50 μ M Ciglitazon bzw. Troglitazon inkubiert und nach 2 bzw. 4 h die Freisetzung des Cytochrom *c* überprüft. Als Positiv-Kontrolle wurde die Apoptose durch Staurosporin

(STS) oder durch die Kombination aus den Inhibitoren der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette (Rotenon/TTFA) induziert (Abb. 20A, B).

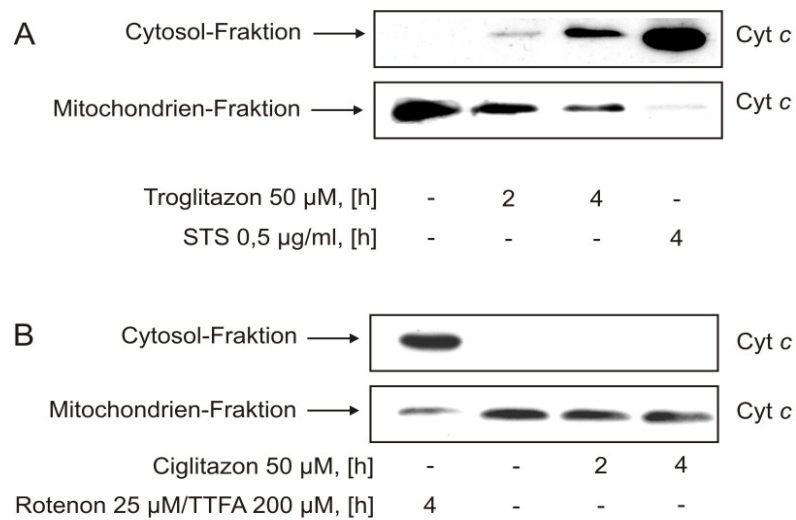


Abb. 20: Troglitazon induziert die Freisetzung von Cytochrom *c*, wohingegen der Ciglitazon-induzierte Zelltod unabhängig von der Cytochrom *c*-Freisetzung verläuft. Jurkat P⁺ Zellen wurden mit (A) 50 µM Troglitazon, 0,5 µg/ml Staurosporin (STS) oder (B) 50 µM Ciglitazon bzw. der Kombination 25 µM Rotenon (Komplex I-Inhibitor)/200 µM TTFA (Komplex II-Inhibitor) für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert oder blieben unbehandelt. Freigesetztes cytosolisches und in der Mitochondrienfraktion befindliches Cytochrom *c* wurden, wie in Methoden 3.13.4 beschrieben, nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot aus 3 verschiedenen Experimenten.

Wie aus Abb. 20A ersichtlich, führte die Inkubation mit 50 µM Troglitazon bereits nach 2 h und verstärkt nach 4 h zu einer Cytochrom *c*-Freisetzung in das Cytosol (Abb. 20A, Bahnen 2 und 3). Dies bestätigte wiederum Apoptose als verantwortlichen Mechanismus für den nachgewiesenen Zelltod. Nach Induktion der Apoptose durch STS für 4 h konnte im Cytosol nahezu der gesamte Anteil des Cytochrom *c* nachgewiesen werden und dementsprechend in der Mitochondrien-Fraktion nur noch in Spuren. Somit konnte die Funktionalität dieser Methode als Apoptose-Nachweis bestätigt werden (Abb. 20A, Bahn 4). Im Gegensatz zur Troglitazon-Inkubation führte die Zugabe von 50 µM Ciglitazon weder nach 2 noch nach 4 h zu einer detektierbaren Freisetzung von Cytochrom *c* ins Cytosol (Abb. 20B, Bahnen 3 und 4) trotz des nachgewiesenen Zelltodes durch die DiOC₆(3)-Färbung bzw. das Annexin V-FITC/PI-Assay. Dies bestätigte die Annahme, dass der Ciglitazon-induzierte Zelltod in Jurkat P⁺ Zellen nekrotischen Charakter aufweist. Die Kombination der Atmungskette-Inhibitoren Rotenon (Komplex I) und TTFA (Komplex II) führte zur Induktion der Apoptose nach 4 h, welche anhand des im Cytosol nachgewiesenen Cytochrom *c* bestätigt werden konnte (Abb.

20B, Bahn 1). Somit führte auch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette zur Apoptose.

Anhand der in Abschnitt 4.2.2 dargestellten Nachweisverfahren konnte eine Apoptose-Induktion durch Troglitazon sowie eine Zelltod-Induktion mit nekrotischem Charakter nach Ciglitazon in der T-Zelllinie Jurkat P⁺ nachgewiesen werden. Dahingegen führte Rosiglitazon als weiteres getestetes TZD unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht zum Zelltod. Ein in der Literatur beschriebener wichtiger Faktor hinsichtlich der Apoptose- bzw. Nekrose-Induktion in T-Zellen, ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [12]. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Rolle der ROS bezüglich der beobachteten cytotoxischen Effekte der TZDs näher untersucht.

4.2.3 Einfluss der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die Zelltod-Induktion

In Jurkat T-Zellen konnte bereits eine signifikante Produktion von ROS nach TZD-Inkubation nachgewiesen werden [120]. Somit kamen ROS auch in dem von mir verwendeten Testsystem der Jurkat P⁺ Zellen als potentielle Zelltod-Induktoren in Frage. Zunächst wurden daher die relativen ROS-Produktionen infolge der Inkubation mit Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon verglichen (Abb. 21).

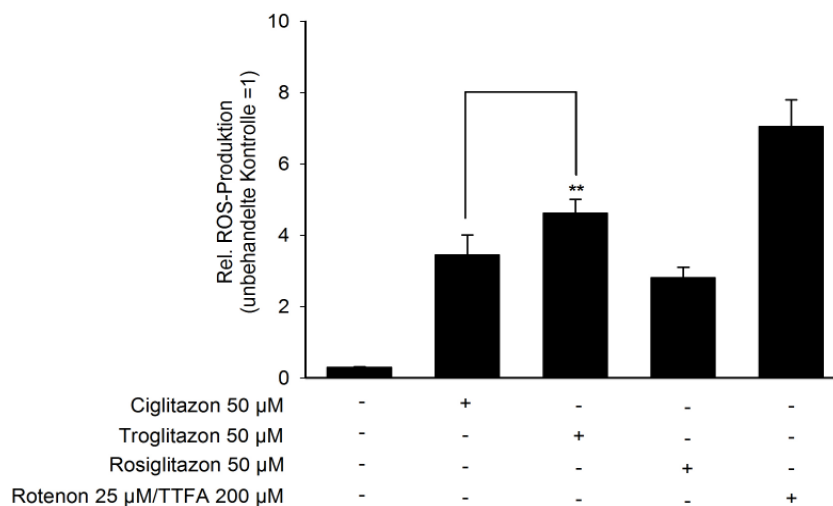


Abb. 21: Relative ROS-Produktion infolge von Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon in Jurkat P⁺ Zellen. Jurkat P⁺ Zellen wurden mit H₂DCF-DA gefärbt und anschließend mit jeweils 50 µM Ciglitazon, Troglitazon, Rosiglitazon oder der Kombination 25 µM Rotenon (Komplex I-Inhibitor)/200 µM TTFA (Komplex II-Inhibitor) für 2 h inkubiert bzw. blieben unstimuliert. Die Produktion der ROS anhand der H₂DCF-DA-Oxidation wurde im Durchflusszytometer bestimmt, wie in Methoden 3.19 beschrieben. Die relative ROS-Produktion der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. aus n = 6, **, $p < 0,01$.

Es zeigte sich, dass die drei getesteten TZDs zu einer deutlichen Produktion von ROS führten. Ciglitazon und Rosiglitazon verursachten, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ungefähr gleich große Mengen an ROS (Abb. 21, Ciglitazon, Balken 2 und Rosiglitazon, Balken 4 vs. Kontrolle, Balken 1), die jedoch niedriger waren als die durch Troglitazon-verursachten Mengen an ROS (Abb. 21, Troglitazon, Balken 3). Da die Störung der mitochondrialen Atmungskette als potenter Mechanismus für eine ROS-Produktion beschrieben wurde [121], diente die Kombination aus den Inhibitoren für den Komplex I (Rotenon) und Komplex II (TTFA) als Positiv-Kontrolle zur Erzeugung von ROS in den Jurkat P⁺ Zellen. Den Erwartungen entsprechend führte die Hemmung der Komplexe I und II durch die Inkubation mit der Kombination Rotenon/TTFA zur stärksten ROS-Produktion (Abb. 21, Rotenon/TTFA, Balken 5).

Da nun ROS als potentielle Apoptose-Stimuli nach TZD-Inkubation identifiziert werden konnten, sollte mit Hilfe von Antioxidantien überprüft werden, ob die gebildeten ROS für die Induktion der Nekrose durch Ciglitazon bzw. die Apoptose durch Troglitazon in den Jurkat P⁺ Zellen verantwortlich waren (Abb. 22). Hierfür wurden die Zellen mit den angegebenen Antioxidantien für 2 h vorinkubiert gefolgt von der Stimulation mit Ciglitazon (Abb. 22A) bzw. Troglitazon (Abb. 22B). Der Zelltod wurde mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung ermittelt, wobei die Zelltodrate durch die alleinige Ciglitazon- (Abb. 22A, Ciglitazon, Balken 1) bzw. Troglitazon-Inkubation (Abb. 22B, Troglitazon, Balken 1) als 100% definiert wurde.

Die Vorinkubation mit dem Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) (Abb. 22A, NAC, Balken 2) führte zu keiner signifikanten Hemmung der Ciglitazon-induzierten Nekrose (Abb. 22A, Ciglitazon, Balken 1). Im Gegensatz dazu hemmte die Vorinkubation mit 300 µM Vitamin C (Abb. 22A, Vit C, Balken 3) die Nekrose um ca. 40% und mit 100 µM MnTBAP (Mangan(III) tetrakis (4-Benzoessäure) porphyrin), einem Superoxiddismutase-Mimetikum, welches in Jurkat als potenter ROS-Inhibitor beschrieben wurde [10, 122-124], um ca. 30% (Abb. 22A, MnTBAP, Balken 5). Darüber hinaus spielt vermutlich auch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eine wichtige Rolle, denn die Vorinkubation mit 100 U/ml Katalase konnte die Ciglitazon-induzierte Nekrose um ca. 35% reduzieren (Abb. 22A, Katalase, Balken 4). Somit tragen ROS und H₂O₂ zumindest deutlich zu der Ciglitazon-induzierten Nekrose bei.

Die Troglitazon-induzierte Apoptose konnte durch die 2-stündige Vorinkubation mit den Antioxidantien Vitamin C (Abb. 22B, Vit C, Balken 3) und MnTBAP (Abb. 22B, MnTBAP, Balken 5) im Vergleich zu der Stimulation mit Troglitazon alleine (Abb. 22B, Troglitazon, Balken 1) um lediglich 20% reduziert werden. Dahingegen zeigten NAC (Abb. 22B, NAC,

Balken 2) und Katalase (Abb. 22B, Katalase, Balken 4) keinen cytoprotektiven Effekt hinsichtlich der Troglitazon-vermittelten Apoptose. Somit sind offensichtlich im Gegensatz zur Ciglitazon-induzierten Nekrose die ROS nur marginal und H_2O_2 gar nicht an der Troglitazon-induzierten Apoptose beteiligt.

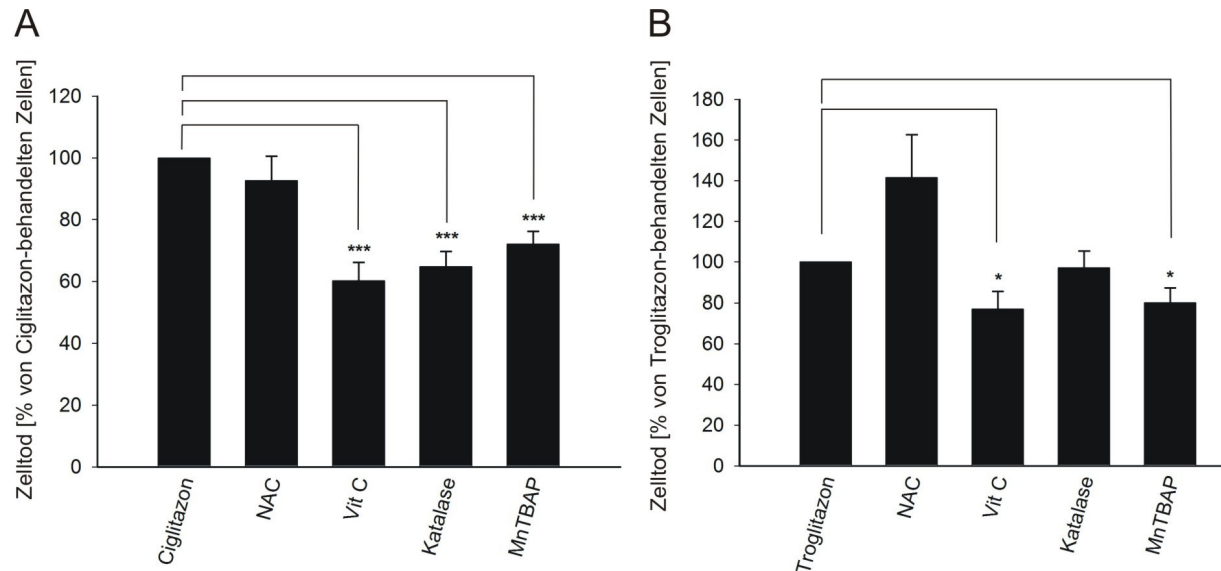


Abb. 22: Die Ciglitazon-induzierte Nekrose in Jurkat P^+ Zellen ist ROS und H_2O_2 -abhängig, wogegen die Troglitazon-abhängige Apoptose nur marginal ROS-vermittelt abläuft. Jurkat P^+ Zellen wurden für 2 h mit den Antioxidantien 5 mM NAC, 300 μ M Vitamin C, 100 U/ml Katalase oder 100 μ M des SOD-Mimetikums MnTBAP inkubiert, gefolgt von einer 4-stündigen Stimulation mit (A) 50 μ M Ciglitazon bzw. (B) 50 μ M Troglitazon. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung, wie in Methoden (3.13.1) beschrieben, die Zelltodrate im Durchflusszytometer bestimmt. Die Inhibition des Zelltodes durch die Antioxidantien ist dargestellt in Prozent der durch Ciglitazon- bzw. Troglitazon-induzierten Zelltodrate, welche als 100% definiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. aus $n = 8$. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Da die getesteten TZDs zu einer schnellen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führten (Abb. 18) und zudem massiv ROS entstanden (Abb. 21), die maßgeblich an der Ciglitazon-induzierten Nekrose und zum Teil an der Troglitazon-induzierten Apoptose beteiligt waren (Abb. 22), ist ein Einfluss der TZDs auf die mitochondriale Atmungskette sehr wahrscheinlich, worauf auch Literaturbefunde hindeuten (siehe 1.2.4.3). Im Folgenden sollten daher die Effekte der getesteten TZDs Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon hinsichtlich ihrer Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette genauer charakterisiert werden.

4.2.4 Wirkungen von Thiazolidindionen auf die mitochondriale Atmungskette

Zur Untersuchung dieser Fragestellung eigneten sich besonders gut submitochondriale Partikel (SMPs). SMPs stellen ein zellfreies Testsystem dar und entstehen beim Aufbrechen von Mitochondrien aus der inneren Mitochondrienmembran. Es handelt sich um so genannte ‚inside-out‘ oder ‚invertierte‘ Membranvesikel, bei denen die dem Matrixraum zugewandte Fläche, welche die Komplexe I bis IV der Atmungskette beinhaltet, nun auf der Außenseite liegt. Durch Zugabe von Substraten der Komplexe kann die Atmung initiiert werden und somit die Wirkung der zu testenden Substanzen auf die Atmung anhand des Sauerstoffverbrauches gemessen werden.

Zunächst wurde die Wirkung der TZDs Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon auf die Komplex I-abhängige Atmung, d. h. die NADH-Oxidase-Aktivität untersucht (3.18.1). Hierzu wurde die Atmung in SMPs durch das Komplex I-Substrat NADH gestartet. Die basale Atmungsrate der unbehandelten Kontrolle betrug dabei $0,92 \mu\text{M O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und wurde als 100% definiert. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser SMPs mit steigenden Konzentrationen (1 - 30 μM) an Ciglitazon (Abb. 23A, schwarze Kreise), Troglitazon (Abb. 23A, weiße Kreise), Rosiglitazon (Abb. 23A, schwarze Dreiecke) oder dem spezifischen Komplex I-Inhibitor Rotenon als Positiv-Kontrolle (Abb. 23A, weiße Dreiecke). Die Detektion des Sauerstoff-Verbrauches erfolgte mit Hilfe eines Oxygraphen. Die komplette Hemmung der NADH-Oxidase-Aktivität durch Rotenon (Abb. 23A, weiße Dreiecke) bestätigte hierbei die Funktionalität des Assays. Es konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Komplex I-abhängigen Atmung mit allen getesteten TZDs identifiziert werden. Eine nahezu komplette Hemmung der Atmung wurde mit Konzentrationen von mehr als 10 μM an Ciglitazon und Troglitazon erreicht, wogegen Rosiglitazon bei der höchsten getesteten Konzentration von 30 μM die Atmung um ca. 80% inhibierte (Abb. 23A).

Um die nachgewiesene Inhibition der Komplex I-abhängigen Atmung durch die TZDs zu verifizieren, wurde die spezifische Komplex I-Aktivität, d. h. die NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität (3.18.1), überprüft (Abb. 23B). Auch bei diesem Assay zeigte der etablierte, spezifische Komplex I-Inhibitor Rotenon eine vollständige Hemmung (Abb. 23B, weiße Dreiecke) und bestätigte damit wiederum die Funktionalität der Nachweismethode. Alle getesteten TZDs hemmten die basale NADH:DBQ-Aktivität, welche bei $0,67 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ lag. Auch hier war Ciglitazon der potenteste Komplex I-Inhibitor (Abb. 23B, schwarze Kreise) gefolgt von Troglitazon (Abb. 23B, weiße Kreise) und, am schwächsten, Rosiglitazon (Abb. 23B, schwarze Dreiecke).

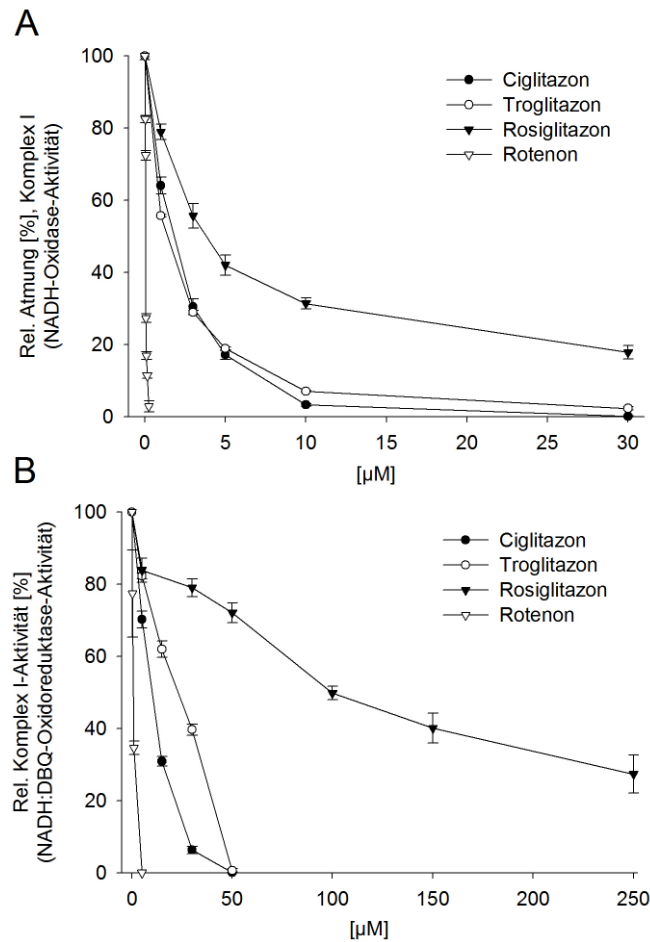


Abb. 23: TZDs hemmen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Die SMPs wurden, wie in Methoden 3.17 beschrieben, hergestellt und mit steigenden Konzentrationen (1 - 250 μM) an Ciglitazon, Troglitazon, Rosiglitazon oder dem Komplex I-Inhibitor Rotenon inkubiert bzw. blieben unbehandelt. (A) Die Atmung in den SMPs wurde durch die Zugabe des Komplex I-Substrates NADH gestartet und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe eines Oxygraphen gemessen, wie in Methoden 3.18.1 beschrieben. Die Atmungsraten wurden als Prozentsatz der Atmungsrates der unbehandelten Kontrolle (100%) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 3$. (B) Die NADH:DBQ-Aktivität wurde, wie in Methoden 3.18.1 beschrieben, ermittelt. Die Werte sind relativ zur NADH-Oxidationsrate der unbehandelten Kontrolle ($0,67 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} = 100\%$) in % dargestellt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm S.D. aus $n = 3$.

Verglichen mit der Hemmung der NADH-Oxidase-Aktivität waren höhere Konzentrationen an TZDs bei der Inhibition der NADH:DBQ-Aktivität notwendig (vgl. TZD Konzentrationen Abb. 23A vs. B). Dieser Unterschied, der besonders beim Rosiglitazon hervorsticht, kann zum einen möglicherweise durch die direkte Konkurrenz um das Substrat Ubiquinon (DBQ) kommen, welches beim NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivitätstest in höheren Konzentrationen vorlag. Zum anderen kann der Unterschied eventuell auch auf spezifische Eigenschaften der Bindungsdomäne zurückzuführen sein, denn es ist bekannt, dass der Komplex I eine relativ große Ubiquinon-Bindungstasche mit drei sich überlappenden Bindungsstellen für verschiedene Inhibitor-Klassen besitzt [110]. Daher könnte Rosiglitazon

bei der Messung der NADH-Oxidase-Aktivität den Zugang des hoch-hydrophoben intrinsischen Substrates Q_{10} zur Ubiquinon-Bindungstasche effektiv geblockt haben, jedoch nicht die Bindung des kleineren und mehr hydrophilen Ubiquinonderivates DBQ, welches beim spezifischen NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivitätstest verwendet wurde. Aus diesem Grund konnte dieses vermutlich immer noch bis zu einem gewissen Maß an die Ubiquinon-Reduktionsstelle binden, wodurch eventuell die die Unterschiede bei den benötigten Konzentrationen zur Hemmung hervorrief.

Anschließend wurde die Wirkung der TZDs auf die Aktivität des Komplexes II untersucht (Abb. 24). Hierfür wurde zunächst die Atmung in SMPs über den Komplex II durch die Zugabe des Substrates Na-Succinat gestartet, wobei die basale Atmungsrate der unbehandelten Kontrolle ($0,31 \mu\text{mol O min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) als 100% definiert wurde. Diese SMPs wurden mit steigenden Konzentrationen (1 - 30 μM) der TZDs Ciglitazon (Abb. 24A, schwarze Kreise), Troglitazon (Abb. 24A, weiße Kreise) oder Rosiglitazon (Abb. 24A, schwarze Dreiecke) inkubiert und die Atmungsrate mit Hilfe des Oxygraphen bestimmt. Im Gegensatz zu Rosiglitazon, welches die Komplex II-abhängige Atmung nicht inhibierte, konnte eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung nach Ciglitazon und Troglitazon identifiziert werden. Dabei führte die Inkubation mit Ciglitazon bei 30 μM zu einer Reduktion der Atmung um ca. 70% (Abb. 24A, schwarze Kreise), wohingegen Troglitazon bei der gleichen Konzentration die Atmung um nur 40% inhibierte (Abb. 24A, weiße Kreise). Die Eignung des Testsystems zur Untersuchung der Komplex II-abhängigen Atmung konnte durch den Einsatz des beschriebenen spezifischen Komplex II-Inhibitors TTFA bestätigt werden, welcher die Atmungsrate konzentrationsabhängig inhibierte (Abb. 24C, weiße Kreise, Succinat-Oxidase-Aktivität). Zusätzlich wurde die spezifische Komplex II-Aktivität, d. h. die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität (3.18.2), mit Hilfe der SMPs bestimmt (Abb. 24B). Die Funktionalität dieses Nachweisverfahrens wurde anhand der Hemmung der Reduktion von DCIP (als Maß für die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität) durch den Komplex II-spezifischen Inhibitor TTFA bestätigt (Abb. 24C, schwarze Kreise, Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität). Im Vergleich zur Messung der Komplex II-abhängigen Atmung waren höhere TZD-Konzentrationen zur Reduktion der Komplex II-Aktivität notwendig. Trotzdem führten auch hier steigende Konzentrationen (30 - 100 μM) der TZDs Ciglitazon (Abb. 24B, schwarze Kreise) und Troglitazon (Abb. 24B, weiße Kreise) zu einer Hemmung der spezifischen Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 μM führte Ciglitazon zu einer Hemmung um ca. 55% und Troglitazon um ca. 50%. In Übereinstimmung mit den Daten der

Komplex II-abhängigen Atmung, hatte Rosiglitazon (Abb. 24B, schwarze Dreiecke) keinen Einfluss auf die Komplex II-Aktivität.

Somit stellten die TZDs Ciglitazon und Troglitazon potentielle Komplex II-Inhibitoren dar, wohingegen Rosiglitazon keinen Einfluss auf den Komplex II hatte.

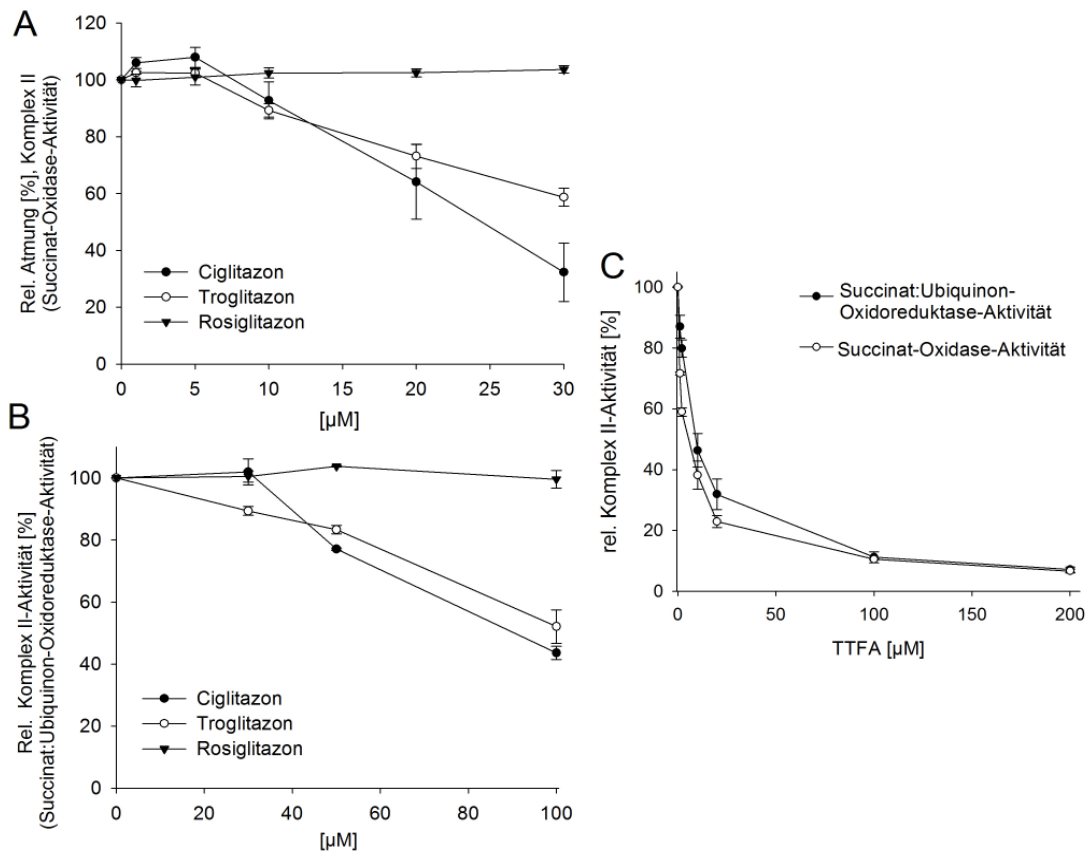


Abb. 24: Ciglitazon und Troglitazon hemmen im Gegensatz zu Rosiglitazon den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette. Die SMPs wurden, wie in Methoden 3.17 beschrieben, hergestellt und mit steigenden Konzentrationen (1 - 100 μM) an Ciglitazon, Troglitazon, Rosiglitazon inkubiert bzw. blieben unbehandelt. (A) Die Atmung in den SMPs wurde durch die Zugabe des Komplex II-Substrates Natrium-Succinat gestartet und der Sauerstoff-Verbrauch mit Hilfe eines Oxygraphen gemessen, wie in Methoden 3.18.2 beschrieben. Die Atmungsraten wurden als Prozentsatz der Atmungsrate der unbehandelten Kontrolle (100%) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 3$. (B) Die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität wurde, wie in Methoden 3.18.2 beschrieben, ermittelt, wobei jeder Messpunkt den Mittelwert \pm S.D. aus drei separaten Experimenten repräsentiert. (C) Die SMPs wurden mit steigenden Konzentrationen des etablierten Komplex II-Inhibitors TTFA (1 - 200 μM) inkubiert und die rel. Atmung, d. h. Succinat-Oxidase-Aktivität bzw. die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität, wie in Methoden 3.18.2 beschrieben, bestimmt. Die Komplex II-Aktivität wurde jeweils in Prozent der unbehandelten Kontrolle (100%) berechnet. $n = 2 \pm$ S.D.

Nachdem nun festgestellt wurde, dass die getesteten TZDs die Aktivitäten der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette beeinflussten, sollte mit Hilfe spezifischer,

beschriebener Inhibitoren deren Einfluss auf die Induktion des Zelltodes in Jurkat P⁺ Zellen überprüft werden.

4.2.5 Mechanismen des Thiazolidindion-induzierten Zelltodes

Hierzu wurden die etablierten Inhibitoren Rotenon für den Komplex I und TTFA für den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette verwendet (Abb. 25). Die Zelltodrate wurde mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung nach einer 4-stündigen Inkubation bestimmt.

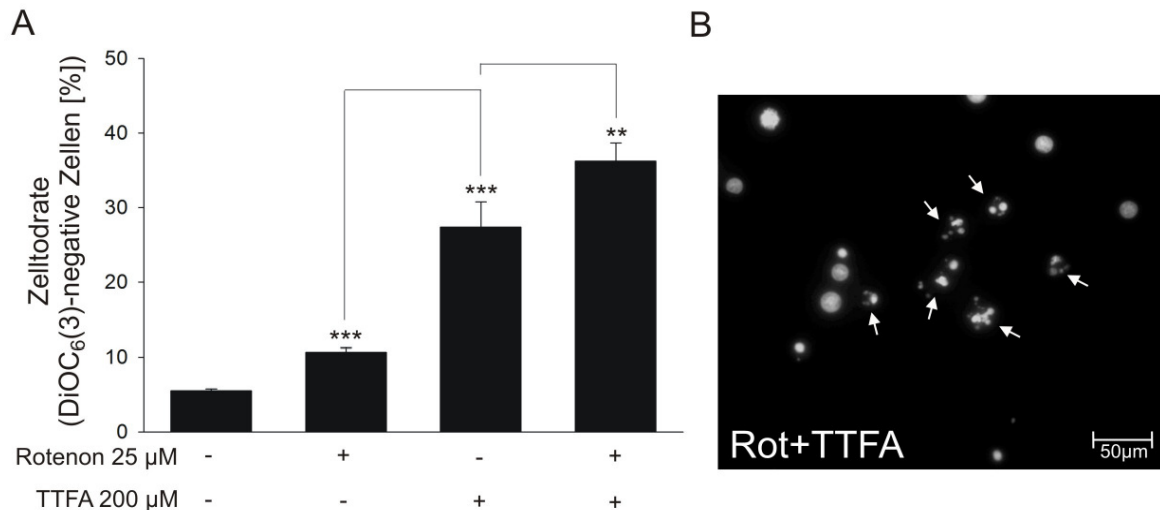


Abb. 25: Die Hemmung der Komplexe I und II führt zur Induktion der Apoptose in Jurkat P⁺ Zellen. Jurkat P⁺ Zellen wurden mit 25 µM Rotenon (Komplex I-Inhibitor), 200 µM TTFA (Komplex II-Inhibitor) bzw. in Kombination (Rotenon/TTFA) inkubiert bzw. blieben unstimuliert. (A) 4 h nach Inkubation wurde die Zelltodrate (% DiOC₆(3)-negative Zellen) mit Hilfe der DiOC₆(3)-Färbung, wie in den Methoden 3.13.1 beschrieben, im Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. aus n = 12. **, *p* < 0,01; ***, *p* < 0,001. (B) Jurkat P⁺ Zellen wurden mit der Kombination Rotenon/TTFA für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne, mittels DAPI-Färbung, wie in den Methoden (3.13.3) beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild, bei dem die weißen Pfeile kondensiertes Chromatin hervorheben. Vergrößerung 400-fach.

Es zeigte sich in den Jurkat P⁺ Zellen, dass die Hemmung des Komplexes I durch 25 µM Rotenon zu einer marginalen Induktion des Zelltodes bis zu 10% (Abb. 25A, Balken 2) im Vergleich zu 5% in der unstimulierten Kontrolle (Abb. 25A, Balken 1) führte. Dahingegen induzierte die Inhibition des Komplexes II durch 200 µM TTFA eine signifikante Zelltodrate bis zu 30% (Abb. 25A, Balken 3), welche durch die zusätzliche Hemmung des Komplexes I mittels Rotenon auf bis zu 40% verstärkt werden konnte (Abb. 25A, Balken 4). Bei dem dabei aufgetretenen Zelltod, handelte es sich um Apoptose, da die Zellkerne dieser Zellen eindeutig kondensiertes Chromatin nach der DAPI-Färbung aufwiesen. Diese Chromatin-

Kondensation ist durch die weißen Pfeile in Abb. 25B markiert. Zudem konnte Apoptose als zugrunde liegender Mechanismus des Zelltodes durch das Annexin V-FITC/PI-Assay bestätigt werden (siehe Abb. 27).

Somit kommt die beobachtete Hemmung der Komplexe I und II durch die TZDs Ciglitazon bzw. Troglitazon (Abb. 23 und Abb. 24) als Ursache des nachgewiesenen Zelltodes prinzipiell in Frage, wodurch jedoch nicht die unterschiedlichen Zelltod-Typen Apoptose vs. Nekrose erklärt werden können. Wie in der Einleitung beschrieben (1.1.3) spielt unter anderem der ATP-Gehalt der Zelle eine entscheidende Rolle, ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch stirbt. Aus diesem Grund wurde der Gehalt an ATP in den Jurkat P⁺ Zellen nach der Inkubation mit den TZDs Ciglitazon bzw. Troglitazon sowie der Kombination Rotenon/TTFA bestimmt (Abb. 26).

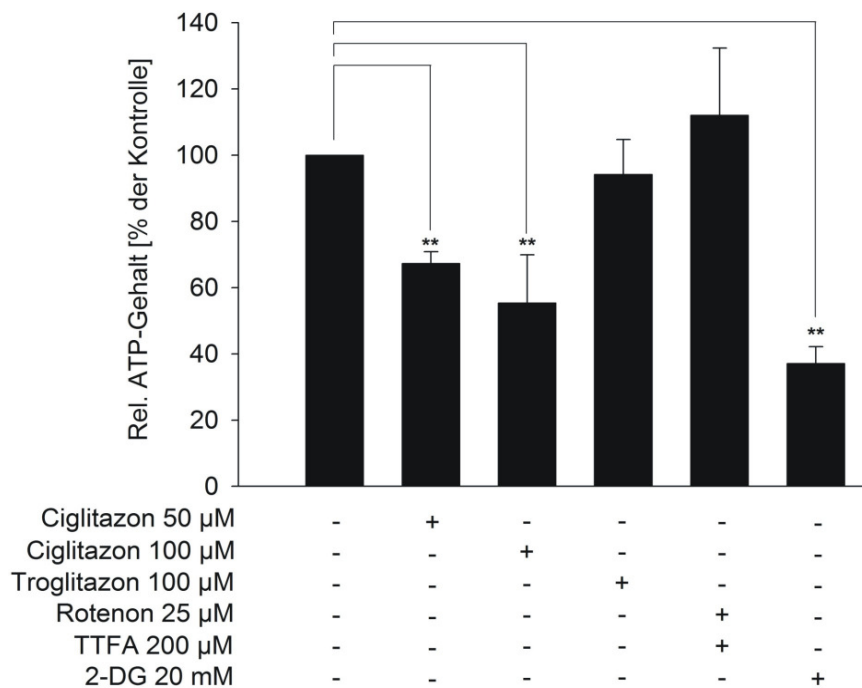


Abb. 26: Ciglitazon reduziert den ATP-Gehalt in Jurkat P⁺ Zellen. Jurkat P⁺ Zellen wurden 2 h mit 50 bzw. 100 µM Ciglitazon, 100 µM Troglitazon, 20 mM 2-DG, der Kombination 25 µM Rotenon/200 µM TTFA inkubiert oder blieben unstimuliert. Der ATP-Gehalt wurde, wie in Methoden (3.20) angegeben, bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle (100%) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.D., n = 5, **, p < 0,01.

Der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrolle wurde als 100% definiert (Abb. 26, Balken 1). Bereits nach 2 h Inkubation mit 50 bzw. 100 µM Ciglitazon (Abb. 26, Balken 2 und 3) konnte eine signifikante Erniedrigung des ATP-Spiegels auf bis zu 50% (Abb. 26, Balken 3) nachgewiesen werden, wohingegen eine Inkubation mit 100 µM Troglitazon (Abb. 26,

Balken 4) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Einfluss hatte. Ebenso bewirkte die Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette durch die Kombination Rotenon/TTFA (Abb. 26, Balken 5) keine Senkung des ATP-Spiegels. Wie erwartet konnte bereits durch eine 2-stündige Hemmung der Glykolyse mit Hilfe des etablierten Glykolyse-Inhibitors 2-Deoxy-Glukose, der ATP-Gehalt der Zelle auf bis zu 40% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden (Abb. 26, Balken 6 vs. Balken 1).

Somit könnte die Ciglitazon-induzierte ATP-Reduktion zusammen mit der nachgewiesenen Hemmung der Komplexe I und II der Atmungskette als Ursache für die beobachtete Nekrose in Frage kommen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in Jurkat P⁺ Zellen der ATP-Gehalt mit Hilfe des Glykolyse-Inhibitors 2-DG reduziert und der Zelltod durch die kombinatorische Inhibition der Komplexe I und II durch Rotenon/TTFA ausgelöst (Abb. 27).

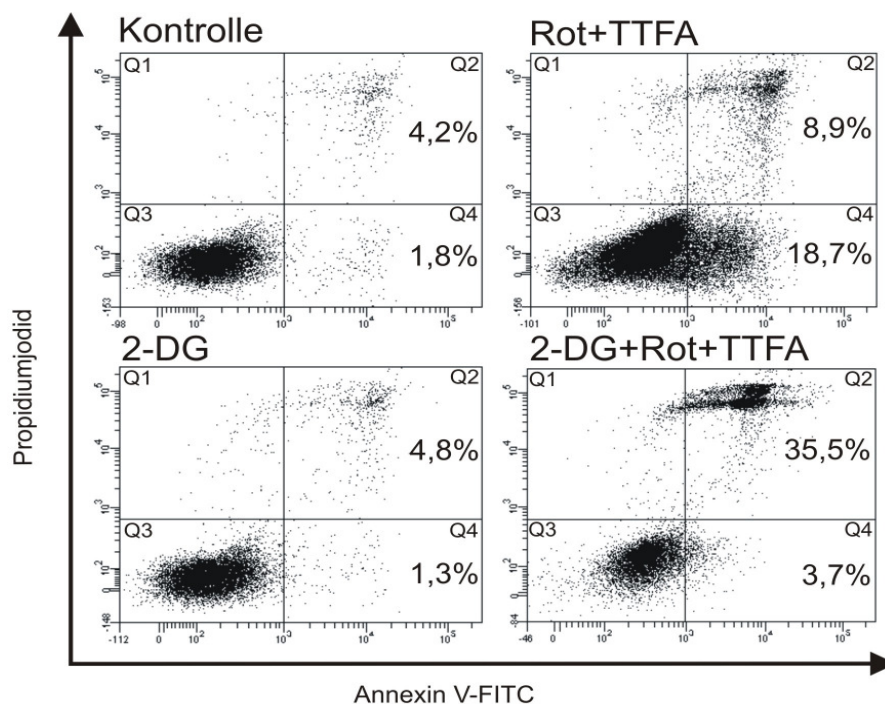


Abb. 27: Die Erniedrigung des ATP-Gehaltes in Jurkat P⁺ Zellen führt zusammen mit der Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette zur Induktion einer Nekrose anstatt Apoptose. Jurkat P⁺ Zellen wurden mit der Kombination 25 μ M Rotenon/200 μ M TTFA, 20 mM 2-DG, der Kombination 25 μ M Rotenon/200 μ M TTFA + 20 mM 2-DG für 4 h inkubiert oder blieben unstimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit Hilfe des Durchflusszytometers ein Annexin V-FITC/PI-Assay, wie in Methoden (3.13.2) beschrieben, durchgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Anhand des Annexin V-FITC/PI-Assays konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Komplexe I und II durch die Kombination Rotenon/TTFA in den Jurkat P⁺ Zellen nach 4 h zu einer Induktion der Apoptose führte, da vornehmlich Annexin V-FITC-positive Zellen (Abb. 27, Rot+TTFA Q4: 18,7%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 27, Kontrolle Q4: 1,8%) nachweisbar waren. Nur ein kleiner Anteil der Zellen war Annexin V-FITC/PI-positiv, d. h. sekundär-nekrotisch, mit 8,9% im Vergleich zu 4,2% in der Kontrolle (Abb. 27, Rot+TTFA Q2 vs. Kontrolle Q2). Die alleinige Reduktion des ATP-Gehaltes in den Jurkat P⁺ Zellen durch die Hemmung der Glykolyse mittels 2-Deoxy-Glukose führte zu keinem nachweisbaren Zelltod nach 4 h (Abb. 27, 2-DG). Dahingegen führte eine 2-DG-vermittelte Erniedrigung des ATP-Gehaltes in Kombination mit der Inhibition der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon/TTFA zu einer starken Induktion des Zelltodes, welcher nekrotische Merkmale aufwies (Abb. 27, 2-DG+Rot+TTFA). Im Vergleich zur alleinigen Komplex I und II Hemmung, bei der lediglich 8,9% Annexin V-FITC/PI-positiv waren (Abb. 27, Rot+TTFA, Q2), führte die Erniedrigung des ATP-Gehaltes bei gleichem Stimulus zu einer starken Erhöhung des Anteils an Annexin V-FITC/PI-positiven Zellen auf 35,5% (Abb. 27, 2-DG+Rot+TTFA, Q2). Dahingegen konnte keine signifikante Apoptose anhand Annexin V-FITC-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 27, 2-DG+Rot+TTFA, Q4: 3,7% vs. Kontrolle, Q4: 1,8%). Dies wies darauf hin, dass die Erniedrigung des ATP-Gehaltes in den Jurkat P⁺ Zellen die durch die kombinatorische Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette induzierte Apoptose in Richtung Nekrose verschieben kann. Somit wird die Hypothese unterstützt, dass die Ciglitazon-induzierte Erniedrigung des ATP-Gehaltes in Kombination mit der Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette zur Induktion der Nekrose führt, wohingegen Troglitazon, welches im Gegensatz zu Ciglitazon den ATP-Spiegel nicht beeinflusst, Apoptose induziert.

Diese erworbenen Erkenntnisse hinsichtlich der möglichen PPAR γ -unabhängigen Wirkung der TZDs auf den Zelltod in Jurkat T-Zellen müssen berücksichtigt werden, wenn TZDs als PPAR γ -Aktivatoren eingesetzt werden sollen, wie z. B. bei Diabetes mellitus Typ-2, als potentielle Therapeutika zur Behandlung von Krebs, sowie bei inflammatorischen und neurodegenerativen Krankheiten [63]. Die PPAR γ -unabhängigen cytotoxischen Effekte der TZDs Ciglitazon und Troglitazon traten in dem von mir verwendeten Testsystem, bei dem keine PPAR γ -Expression vorlag, erst besonders stark bei TZD-Konzentrationen weit oberhalb den EC₅₀-Werten zur PPAR γ -Aktivierung auf. Liegt eine PPAR γ -Expression vor

sind die TZDs allerdings auch aufgrund ihrer beschriebenen PPAR γ -aktivierenden Funktion in der Lage Apoptose in T-Zellen zu induzieren, wie in 1.2.5.3 beschrieben. Somit entscheidet wahrscheinlich die *in vivo* tatsächlich wirkende TZD-Konzentration, die aufgrund der Resorptionseigenschaften in verschiedenen Geweben unterschiedlich sein könnte, in wie weit PPAR γ -unabhängige bzw. -abhängige cytotoxische Signalwege induziert werden.

5 DISKUSSION

5.1 Nachweis der PPAR γ abhängigen Apoptose von T-Zellen im pathophysiologischen Verlauf der Sepsis

PPAR γ wurde ursprünglich als wichtiger Regulator der Adipozytendifferenzierung und des Glukose-Metabolismus identifiziert [20]. Deshalb spielt dieser Transkriptionsfaktor bei Krankheiten, die den Glukose-Stoffwechsel betreffen, eine sehr wichtige Rolle. In neueren Studien rückt jedoch das wissenschaftliche Interesse an anti-inflammatorischen [22-24] und pro-apoptotischen Wirkungen von PPAR γ [25-28] vor allem bei der Immunantwort immer mehr in den Vordergrund. Die Identifikation von PPAR γ als wichtiger Regulator in Immunzellen führt zu der Annahme, dass er auch eine wichtige Rolle bei Krankheiten spielen könnte, die das Immunsystem betreffen. Darauf basierend wurde die Hypothese entwickelt, dass PPAR γ in den pathophysiologischen Verlauf der Sepsis involviert sein könnte, denn bei dieser Krankheit ist sowohl die Balance zwischen anti- und pro-inflammatorischen Signalwegen, als auch die Regulation der Apoptose von Immunzellen außer Kontrolle. Vor allem in der hypo-inflammatorischen Phase kommt es zur Lymphopenie, d. h. zur Depletion von Lymphozyten, wobei besonders T-Zellen betroffen sind, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen. Die auftretende Lymphopenie trägt sehr deutlich zur Immunparalyse bei, in deren Folge ein stark erhöhtes Risiko zum Erwerb einer möglicherweise tödlichen Sekundärinfektion besteht. Für die Entwicklung neuer Sepsis-Therapie-Konzepte ist die Kenntnis sämtlicher Signalwege, die zu der Lymphopenie beitragen elementar. Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Aktivierung von PPAR γ in T-Zellen und der bei der Sepsis auftretenden Lymphopenie, war daher Gegenstand meiner Studien.

5.1.1 Verifizierung der Lymphopenie in den gesammelten Blutproben von Sepsis-Patienten

Die Lymphopenie tritt sehr häufig im Verlauf einer Sepsis auf [96] und konnte auch in den für diese Studie gesammelten Blutproben bestätigt werden. Bei der Analyse der Leukozytenverteilung zeigte sich, dass besonders CD4⁺ T-Zellen depletiert waren, wohingegen sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen, im Vergleich zu gesunden Spendern, nicht signifikant unterschied. Diese Daten unterstützen Ergebnisse anderer Studien, in denen ebenfalls eine signifikante Depletion vor allem von CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden

konnte [100, 125]. Sehr wahrscheinlich ist dabei die Lymphopenie auf die apoptotische Depletion der Lymphozyten zurückzuführen, denn in Studien von Hotchkiss et al. konnten stark erhöhte Apoptoseraten der Lymphozyten in Patienten, die an einer Sepsis verstarben, nachgewiesen werden [98, 99]. Jedoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die niedrigere Anzahl an nachgewiesenen CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut der Sepsis-Patienten die Folge einer erhöhten Adhäsionsfähigkeit oder einer verstärkten Diapedese war. Hinsichtlich dieser Fragestellung könnte das Maus-Sepsis-Modell, das derzeit etabliert wird (siehe unten), weiterhelfen. Die Signalwege, die zur nachgewiesenen Induktion der Apoptose in den Lymphozyten während der Sepsis führen, sind noch nicht im Detail identifiziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl extrinsische, z. B. über das Fas/FasL-System, also auch intrinsische Apoptose-Signalwege beteiligt sind [96, 98].

5.1.2 Untersuchung der PPAR γ -Expression in T-Zellen septischer Patienten

Da PPAR γ die Funktion humaner T-Zellen maßgeblich beeinflusst, indem es die T-Zell-Aktivierung inhibiert [126] bzw. auch das Überleben aktivierter T-Zellen während einer Entzündung reguliert [65], wurde die Expression von PPAR γ in T-Zellen septischer Patienten mit gesunden Spendern verglichen. Hierbei konnte ich in den T-Zellen der Sepsis-Patienten eine deutliche Induktion der PPAR γ -mRNA-Expression im Vergleich zu den T-Zellen, die aus gesunden Spendern isoliert wurden, identifizieren. Aufgrund des nur gering verfügbaren Probenvolumens und der zum Zeitpunkt der T-Zell-Isolation aus den Blutproben der Sepsis-Patienten bereits stattgefundenen Lymphopenie, war die T-Zell-Ausbeute nach der Isolation relativ niedrig. Daher konnte auch kein Nachweis des PPAR γ -Proteins mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt werden. Jedoch wird davon ausgegangen, dass die bei der Sepsis auftretende mikrobielle Infektion zur T-Zell-Aktivierung führt und damit zu der von mir nachgewiesenen Induktion der PPAR γ -mRNA-Expression, welche die erhöhte Translation des PPAR γ -Proteins zur Folge hat. Diese Annahme wird durch Daten von Wang et al. in primären T-Zellen bestätigt [67], die nach Aktivierung der T-Zellen durch die Antikörperkombination α -CD3/ α -CD28 eine Induktion der PPAR γ -mRNA sowie des PPAR γ -Proteins nachweisen konnten. Somit könnte die nun gefundene erhöhte PPAR γ -Expression in T-Zellen septischer Patienten diese gegenüber einer PPAR γ -Aktivierung durch potentielle Liganden sensitivieren, welche zur Induktion der Apoptose und damit zur ebenfalls beobachteten Lymphopenie führen kann.

5.1.3 Überprüfung der Sensitivität septischer T-Zellen hinsichtlich der PPAR γ -vermittelten Apoptose

Eine regulatorische Funktion von PPAR γ bei Entzündungsprozessen und bei der Apoptose wurde bereits in vielen Zellsystemen beschrieben, wie z. B. Makrophagen [127], Lungenepithelzellen [128], Tumor-Zellen [129], und Lymphozyten [26, 65, 66]. Mögliche Signalwege, die an der PPAR γ -vermittelten Apoptose beteiligt sind, wurden vorgeschlagen (siehe 1.2.5.3), jedoch scheint es Gewebe- bzw. Zelltyp-spezifische Unterschiede zu geben und genaue Mechanismen, speziell in T-Zellen, sind noch nicht im Detail aufgeklärt.

In Übereinstimmung mit Daten aus Studien, die eine PPAR γ -vermittelte Apoptose in T-Zelllinien bzw. aktivierten primären T-Zellen nach Zugabe des spezifischen PPAR γ -Liganden Ciglitazon zeigen [26, 65, 76], konnte ich in den T-Zellen septischer Patienten, mit nachgewiesener erhöhter PPAR γ -Expression, eine Induktion der Apoptose nach der Inkubation mit Ciglitazon zeigen. Da die hierfür verwendeten septischen T-Zellen *in vivo* bis zum Zeitpunkt der Isolation einer physiologischen Stresssituation ausgesetzt waren, worauf eventuell die leicht erhöhte basale Apoptoserate im Vergleich zu den isolierten T-Zellen gesunder Spender hinwies, war eine generell erhöhte Sensitivität hinsichtlich einer Zelltod-Induktion denkbar. Dies war allerdings auszuschließen, da kein Zelltod durch die Lösungsmittelkontrolle DMSO erfolgte, welches jedoch potentiell Apoptose in T-Zelllinien auslösen kann [130]. Zudem erfolgte keine Erhöhung der Zelltodrate nach Inkubation mit dem PPAR α -Liganden WY14643, von dem eine pro-apoptotische Wirkung in aktivierten Makrophagen gezeigt werden konnte [127].

Zur PPAR γ -Aktivierung wurde der Ligand Ciglitazon aus der Gruppe der TZDs verwendet, welche auch auf PPAR γ -unabhängigen Wegen zum Zelltod führen können. Eine PPAR γ -Abhängigkeit der Ciglitazon-induzierten Apoptose in den septischen T-Zellen ist allerdings aus folgenden Gründen sehr wahrscheinlich: Die PPAR γ -Aktivierung in den T-Zellen septischer Patienten durch die Inkubation mit Ciglitazon als PPAR γ -Ligand führte zur Induktion der Apoptose, welche nach Aktivierung von PPAR α mittels WY14643 nicht eintrat. PPAR α wird ebenfalls in T-Zellen exprimiert [131] und zählt wie PPAR γ zu den PPARs. Durch WY14643 aktiviertes PPAR α bindet analog zu Ciglitazon-aktiviertem PPAR γ an das PPRE, weshalb eine Apoptose-Induktion, wie sie bereits in aktivierten Makrophagen gezeigt werden konnte [127], denkbar gewesen wäre. Da jedoch die Inkubation mit WY14643 im Gegensatz zur Ciglitazon-Inkubation zu keiner Apoptose führte, spricht dies für die PPAR γ -Abhängigkeit des Effektes. Zudem korrelierte die Sensitivität gegenüber der

PPAR γ -vermittelten Apoptose mit der Expression von PPAR γ . Im Gegensatz zu T-Zellen gesunder Spender zeigten die T-Zellen der Sepsis-Patienten eine deutlich gesteigerte PPAR γ -mRNA-Expression sowie stark erhöhte Apoptoseraten infolge der Ciglitazon-Inkubation. Im Falle von PPAR γ -unabhängigen cytotoxischen Effekten durch Ciglitazon hätte man allerdings auch in den T-Zellen gesunder Spender eine Induktion des Zelltodes erwartet. Diese kamen jedoch in meiner Arbeit erst bei Konzentrationen weit über den hier verwendeten 10 μ M zum Tragen. Schließlich ist ein weiteres Argument für die PPAR γ -vermittelte Apoptose nach Ciglitazon, dass dieses auf PPAR γ -unabhängigem Signalweg Nekrose induzierte, jedoch konnte anhand des Annexin V-FITC/PI-Assays eindeutig Apoptose als zugrunde liegender Mechanismus für den nach Ciglitazon-Inkubation induzierten Zelltod in den T-Zellen septischer Patienten festgestellt werden.

Somit lag in den T-Zellen septischer Patienten neben der erhöhten PPAR γ -mRNA-Expression auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber der PPAR γ -vermittelten Apoptose vor, wodurch deren postulierte Beteiligung an der auftretenden Lymphopenie weiterhin bekräftigt wurde.

5.1.4 Die PPAR γ -Aktivierung in T-Zellen erfolgt durch im Sepsis-Plasma vorliegende Liganden

Die bisher gefundene Korrelation zwischen erhöhter PPAR γ -Expression und Sensitivität hinsichtlich PPAR γ -vermittelter Apoptose der T-Zellen septischer Patienten, beweist jedoch noch nicht, dass dieser Mechanismus auch für die zum Zeitpunkt der Zell-Isolation identifizierte Lymphopenie mitverantwortlich war. Wie bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt die erhöhte Expression von PPAR γ infolge der T-Zell-Aktivierung alleine noch nicht zu dessen Aktivierung [26]. Hierfür ist die externe Zugabe von PPAR γ -Liganden notwendig, wie z. B. des erwähnten TZD Ciglitazon bzw. des natürlichen Liganden 15d-PGJ₂. Auch NO, das beispielsweise durch die Zugabe des NO-Donors DEA-NONOate entsteht, führt zur Aktivierung von PPAR γ , basierend auf EMSA-Analysen. Auch in anderen Zellsystemen konnte eine PPAR γ -Aktivierung durch NO bestätigt werden [26, 46]. Um nun die Hypothese der PPAR γ -abhängigen T-Zelldepletion während der Sepsis weiter zu festigen, müsste auch ein *in vivo* vorliegender Ligand nachweisbar sein, der die Aktivierung von PPAR γ und folglich die pro-apoptische Wirkung vermittelt. Potentielle Quellen dieser Liganden könnten Endothelzellen bzw. auch Makrophagen sein. Während einer inflammatorischen Antwort, wie es besonders bei der Sepsis der Fall ist, kommt es in

diesen Zelltypen zur erhöhten iNOS (induzierbare NO-Synthase)-Aktivität und damit zur Freisetzung von NO, als potentieller PPAR γ -Aktivator [46]. Weiterhin werden die Cyclooxygenase-2 [132], sowie die 12/15-Lipoxygenase aktiviert [126], welche eine vermehrte Produktion von Eicosanoiden auslösen, die zu den potentiellen, natürlichen PPAR γ -Liganden zählen (1.2.4.1). Interessanterweise konnte bereits eine erhöhte 15d-PGJ₂-Konzentration in septischem Blut nachgewiesen werden [133]. Mit Hilfe von Reporteranalysen konnte ich in Jurkat T-Zellen nachweisen, dass die Plasmen der Sepsis-Patienten zur Aktivierung des PPARE-Luziferase-Reporters führten. Die PPAR γ -Abhängigkeit dieses Effektes wurde durch die Hemmung dieser Aktivierung infolge der Überexpression einer nicht aktivierbaren PPAR γ -dominant-negativen Mutante (AF2-Mutante) bestätigt. Allerdings ist weiterhin unklar, um welche(n) Liganden es sich handelt.

Schließlich führte die Aktivierung von PPAR γ in Jurkat T-Zellen, bei denen das PPAR γ -Wildtyp-Protein überexprimiert wurde, durch die Inkubation mit den Sepsis-Plasmen bzw. durch den PPAR γ -Liganden Ciglitazon, zur Induktion des Zelltodes. Diesen durch das Sepsis-Plasma- bzw. Ciglitazon-induzierten Zelltod konnte ich wiederum durch die Überexpression der PPAR γ -dominant-negativen Mutante (AF2-Mutante) inhibieren. Dadurch konnte ich beweisen, dass dieser Effekt PPAR γ -vermittelt ist.

Zusammenfassend kann man nun sagen, dass T-Zellen, die aus Sepsis-Patienten isoliert wurden, eine stark erhöhte PPAR γ -mRNA-Expression aufwiesen. Zudem waren sie gegenüber einer PPAR γ -vermittelten Apoptose sensitiviert. Die dafür benötigte PPAR γ -Aktivierung konnte durch das Plasma septischer Patienten hervorgerufen werden. Dies deutete auf das Vorliegen eines oder auch mehrerer potentieller PPAR γ -Liganden im peripheren Blut von Sepsis-Patienten hin. Somit könnte der Mechanismus der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-Zellen entscheidend zur nachgewiesenen Lymphopenie im Verlauf der Sepsis beitragen (Abb. 28).

Die oben vorgestellten Ergebnisse unterstützen zwar sehr deutlich die aufgestellte Hypothese, jedoch muss berücksichtigt werden, dass die für die Studie zur Verfügung stehenden Blutproben von Patienten stammten, die selbstverständlich intensiv-medizinisch betreut wurden und daher ein Einfluss von dabei angewendeten Therapeutika bzw. Therapien nicht ausgeschlossen werden konnte. Somit kann letztlich der Beweis der PPAR γ -vermittelten Apoptose der T-Zellen als beitragender Mechanismus zur Sepsis-induzierten Lymphopenie, nur im Maus-Sepsis-Modell erbracht werden, bei dem PPAR γ selektiv in T-Zellen deletiert ist.

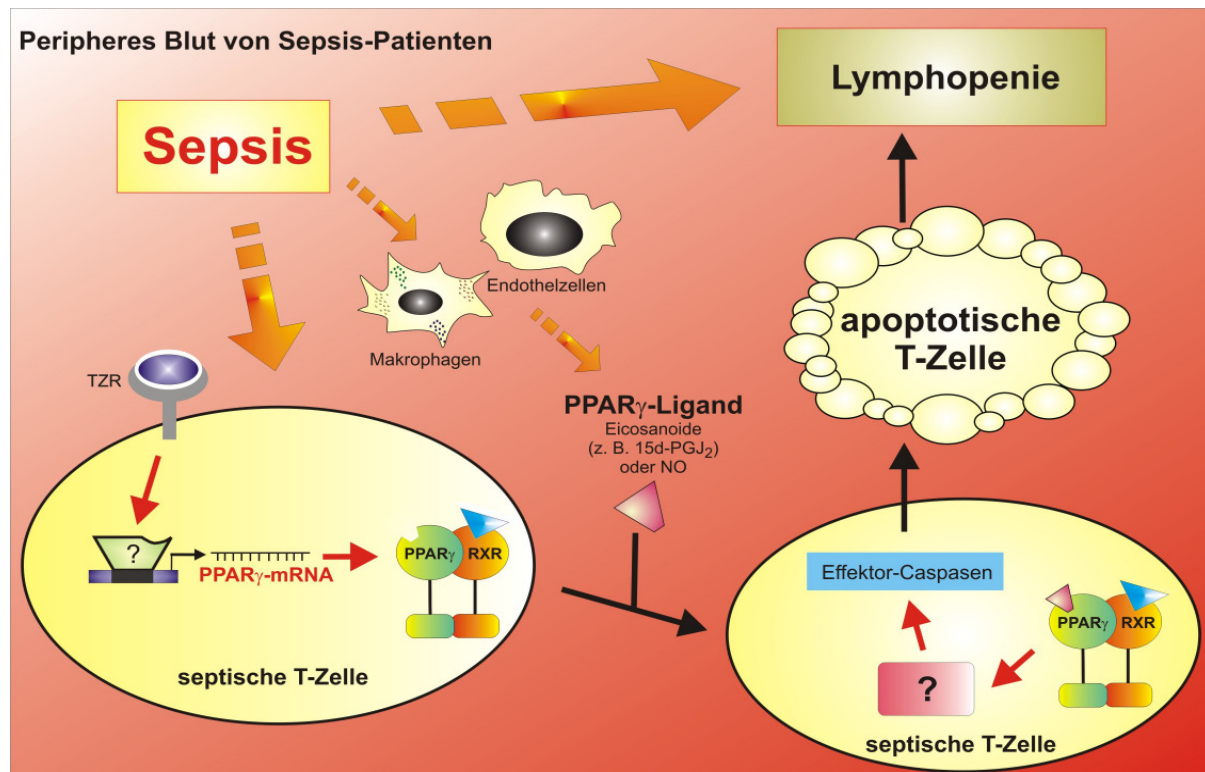


Abb. 28: Zusammenfassung der PPAR γ -vermittelten Apoptose in T-Zellen während der Sepsis: Die im peripheren Blut von Sepsis-Patienten zirkulierenden T-Zellen weisen, vermutlich aufgrund Sepsis-induzierter T-Zell-Aktivierung, eine erhöhte PPAR γ -mRNA-Expression auf (septische T-Zelle, links). Durch die gesteigerte PPAR γ -Expression in diesen T-Zellen ist die Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion infolge der PPAR γ -Aktivierung deutlich erhöht. Die hierfür notwendigen PPAR γ -Liganden/Aktivatoren sind im Plasma der Sepsis-Patienten nachweisbar. Quelle dieser Liganden könnten Makrophagen oder Endothelzellen sein, die infolge der Aktivierung während des septischen Geschehens PPAR γ -Liganden wie z. B. das zu den Eicosanoiden zählende 15d-PGJ₂ oder auch NO bilden könnten. Somit ist ein Beitrag der PPAR γ -vermittelten Apoptose in septischen T-Zellen als potentieller Mechanismus zur nachgewiesenen Sepsis-induzierten Lymphopenie denkbar.

5.1.5 Etablierung des Maus-Sepsis-Modells durch Verwendung einer konditionellen PPAR γ -knock-out-Maus

Die Etablierung des Maus-Sepsis-Modells wird gegenwärtig noch durchgeführt. Hierbei sollte zunächst die konditionelle PPAR γ -knock-out-Maus gezüchtet werden. Dafür standen Mäuse zur Verfügung, bei denen das Exon 2 beider PPAR γ -Allele von loxP-sites flankiert ist (PPAR $\gamma^{fl/fl}$) [134]. Durch die Kreuzung mit Mäusen, bei denen die Expression der Cre (,cyclization recombinase') unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors ist, kann eine konditionelle PPAR γ -knock-out-Maus gezüchtet werden, bei der es durch die Cre-Reaktion zur Deletion dieses Exons 2 kommt und so die fehlende Expression des PPAR γ -

Proteins zur Folge hat [135]. Ich entschied mich für eine Maus, bei der die Expression der Cre unter Kontrolle des T-Zell-spezifischen proximalen *lck*-Promotors steht [117]. Basierend auf der Genotypisierung konnten durch entsprechende Verpaarungen die gewünschten *lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$* -Mäuse gezüchtet werden. Schließlich musste überprüft werden, ob es sich tatsächlich um Tiere handelte, bei denen spezifisch in den T-Zellen eine Deletion von PPAR γ stattfand. Hierfür wurden die T-Zellen aus der Milz isoliert und die genomische DNA extrahiert. Mit Hilfe der PCR-Analyse wurde anschließend die Deletion von PPAR γ überprüft. Hierbei wurden die Primerkombinationen so gewählt, dass bei erfolgter Cre-Reaktion mit der Primerkombination PPAR γ _F/PPAR γ _R2 ein 400 bp Produkt (Deletionsbande) entstand und mit der Primerkombination PPAR γ _F/PPAR γ _R1 ein 275 bp Produkt (loxP-Bande), wenn keine Deletion durch die Cre-Reaktion stattfand. Somit müsste bei erfolgreicher Cre-Reaktion die Deletionsbande in dem Maß zunehmen, wie die loxP-Bande abnimmt. Es zeigte sich, dass in den isolierten T-Zellen der *lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$* -Mäuse eine starke Deletionsbande nachweisbar war, wodurch die prinzipielle Funktionalität der *lck-Cre*-vermittelten Deletion des Exons 2 vom PPAR γ -Gen in den T-Zellen bestätigt werden konnte. Jedoch war auch eine schwächere loxP-Bande nachweisbar, die auf eine zum Teil nicht-stattgefundene Deletion hindeutete. Ursache hierfür waren eventuell Leukozyten, die bei der negativen Selektion in die T-Zell-Fraktion gelangten, denn die Überprüfung der Aufreinigung ergab, dass durchschnittlich 10% andere Leukozyten in der T-Zell-Fraktion vorhanden waren. Da es sich um den T-Zell-spezifischen *lck*-Promotor handelte, wurde eine Cre-Expression in diesen 10% Leukozyten nicht erwartet, weshalb in diesen Zellen auch die loxP-Bande nachweisbar war. Würde man gleiche PCR-Analyse-Effizienzen voraussetzen, könnte der relative Anteil der Intensität der Deletionsbande an der Summe der Intensitäten der loxP-Bande und Deletionsbande, als Maß für die Deletionseffizienz angenommen werden. Da jedoch für deren Nachweis zwei unterschiedliche PCR-Ansätze durchgeführt werden mussten, konnten unterschiedliche Effizienzen der PCR-Analysen per se nicht ausgeschlossen werden. Basierend auf dieser Methode sind somit genaue Angaben hinsichtlich der Deletionseffizienz zurzeit noch nicht möglich. Hierzu müssen weitere Analysen, wie z. B. die Überprüfung der PPAR γ -mRNA- bzw. Protein-Expression in isolierten T-Zellen von *lck-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$* -Mäusen im Vergleich zu PPAR $\gamma^{fl/fl}$ -Mäusen erfolgen. Falls dadurch bestätigt werden kann, dass es sich bei den nun gezüchteten Mäusen um T-Zell-spezifische PPAR γ -knock-out-Mäuse handelt, sollen diese in künftigen Studien eingesetzt werden. Dabei soll durch einen geeigneten Stimulus (LPS-Injektion bzw. CLP

[cecal ligation and puncture']) eine Sepsis ausgelöst werden, um die Rolle von PPAR γ in T-Zellen bei der Sepsis-induzierten T-Zell-Apoptose zu bestätigen.

Basierend auf den Daten aus den Blutproben der Sepsis-Patienten konnte ich zeigen, dass die Aktivierung von PPAR γ in T-Zellen septischer Patienten zur Apoptose führt und somit zur Lymphopenie beitragen könnte. Aufgrund der nachgewiesenen PPAR γ -Aktivierung durch das Sepsis-Plasma liegt die Vermutung nahe, dass im pathophysiologischen Verlauf der Sepsis *in vivo* potentielle PPAR γ -Liganden gebildet werden. PPAR γ trägt somit zur Lymphopenie bei und wirkt generell stark anti-inflammatorisch. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass eventuell eine Hemmung von PPAR γ in der hypo-inflammatorischen Phase therapeutisch interessant sein könnte. Hierdurch könnte möglicherweise der Beitrag von PPAR γ zur Lymphopenie, welche zusammen mit dessen anti-inflammatorischer Wirkung zu einer starken Suppression des Immunsystems führen kann, reduziert werden. Doch kann die anti-inflammatorische Wirkung von PPAR γ vor allem in der hyper-inflammatorischen Phase der Sepsis nützlich sein, denn Daten aus Tierstudien zeigten, dass die PPAR γ -Aktivierung während dieser frühen Phase pro-inflammatorische Signalwege hemmte und damit das Überleben der Tiere förderte (siehe 1.3.4). D. h. eine Aktivierung von PPAR γ durch die Gabe von Liganden könnte einen möglichen Therapie-Ansatz in der frühen Phase der Sepsis darstellen. Als potentielle PPAR γ -Liganden kommen die bereits therapeutisch genutzten Thiazolidindione (TZDs) in Frage, welche jedoch auch PPAR γ -unabhängige Signalwege aktivieren können, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

5.2 Cytotoxische Effekte der Thiazolidindione in der T-Zelllinie Jurkat durch PPAR γ -unabhängige Mechanismen

Die Entdeckung synthetischer, spezifischer PPAR γ -Liganden, vor allem der Thiazolidindione (TZDs), ermöglichte es, Krankheiten, wie z. B. Diabetes mellitus Typ-2, erfolgreich zu behandeln. TZDs werden deshalb auch als ‚Insulinsensitizer‘ bezeichnet, da sie u. a. über die Aktivierung von PPAR γ die Sensitivität gegenüber Insulin erhöhen und so antidiabetisch wirken [48, 52]. Bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ-2 Patienten zeigten sich allerdings schon während der klinischen Studien Nebenwirkungen, die die Klasse der TZDs generell, aber auch individuelle TZD-Verbindungen betrafen, und nicht immer auf deren Aktivierung von PPAR γ zurückzuführen waren. Somit rufen TZDs auch PPAR γ -unabhängige

Effekte hervor, die unbedingt erforscht werden müssen, da TZDs aufgrund ihres Potentials zur PPAR γ -Aktivierung, aber auch aufgrund PPAR γ -unabhängiger Mechanismen, als Therapeutika zur Behandlung von Krebs sowie inflammatorischer und neurodegenerativer Krankheiten diskutiert werden [63]. Aus diesem Grund lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation TZD-vermittelter PPAR γ -unabhängiger Mechanismen hinsichtlich der bereits bekannten cytotoxischen Wirkung.

5.2.1 Auswahl des Testsystems und der verwendeten TZD-Konzentrationen

TZDs können über die Aktivierung von PPAR γ Apoptose in T-Zellen induzieren [26, 65, 66, 74, 76], jedoch sind auch PPAR γ -unabhängige Mechanismen, die zur Zelltod-Induktion führen, bekannt [57]. In dieser Studie habe ich mich auf die PPAR γ -unabhängigen, cytotoxischen Effekte konzentriert, indem ein Jurkat Subklon verwendet wurde, der keine basale PPAR γ -mRNA-Expression aufwies. Nach Aktivierung mit TPA war dieser Klon jedoch prinzipiell in der Lage PPAR γ zu exprimieren, wodurch nahe liegt, dass PPAR γ -vermittelte Signalwege in diesem Klon potentiell vorhanden sein könnten. Allerdings führte die in dieser Studie verwendete TZD-Inkubation zu keiner PPAR γ -Expression. Deshalb eignete sich dieser Klon als Testsystem zur Untersuchung der PPAR γ -unabhängigen, cytotoxischen Effekte und wurde als Jurkat P⁺ bezeichnet. Darüber hinaus waren die in der Studie verwendeten TZD-Konzentrationen weit höher als die EC₅₀-Werte zur PPAR γ -Aktivierung [136]. Aus diesem Grund würden PPAR γ -abhängige Effekte eher in den Hintergrund treten.

In meiner Arbeit wurden mit $\geq 30 \mu\text{M}$ Ciglitazon, Troglitazon oder Rosiglitazon relativ hohe TZD-Konzentrationen verwendet. Diese werden jedoch auch häufig in *in vitro* Studien verwendet und sind auch therapeutisch, d. h. *in vivo* interessant, wenn man die AUC (,area under the curve', ein Maß für die totale Exposition) einkalkuliert. Der AUC-Wert berücksichtigt Expositions-Dauer und -Konzentration einer Substanz im Körper, woraus abgeleitet wird, dass eine geringe Konzentration bei Langzeit-Inkubationen so effektiv sein kann wie eine hohe Konzentration bei Kurzzeit-Inkubationen. So kann beispielsweise der AUC-Wert für Troglitazon eine Serum-Konzentration bis zu $55 \mu\text{M}$ erreichen [57] und liegt damit in dem von mir gewählten Konzentrationsbereich von 30 bis $100 \mu\text{M}$. Zudem muss auch beachtet werden, dass TZDs möglicherweise intrazelluläre Organellen als Ziel haben, wodurch es zur cytosolischen Akkumulation der TZDs und somit wiederum zu höheren Konzentrationen kommen könnte [57].

5.2.2 Verifizierung der cytotoxischen Wirkung von TZDs im Jurkat P⁺ Klon

In Übereinstimmung mit Daten aus der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 [58, 137], konnte ich eine deutliche Induktion der Apoptose durch hohe Konzentrationen an Troglitazon in den Jurkat P⁺ Zellen identifizieren. Apoptose als zugrunde liegender Mechanismus wurde anhand der Phosphatidylserin-Exposition (Annexin V-FITC/PI-Assay), sowie der Freisetzung von Cytochrom *c* ins Cytosol, als auch durch den Nachweis apoptotischer Zellkerne (DAPI-Färbung), die klassische Kennzeichen der Apoptose darstellen, bestätigt. Auch die Inkubation mit Ciglitazon führte zu einem schnellen Zelltod in dem von mir verwendeten Jurkat P⁺ Klon und bestätigt damit Daten früherer Veröffentlichungen in Jurkat T-Zellen [76, 120]. Im Gegensatz zu diesen genannten Studien, wiesen die Jurkat P⁺ Zellen in meinen Experimenten nach Ciglitazon-Inkubation einen nekrotischen Zelltod auf, denn die Membranintegrität war ohne vorangegangene Phosphatidylserin-Exposition zerstört, und es konnten weder apoptotische Zellkerne noch eine Freisetzung von Cytochrom *c* ins Cytosol nachgewiesen werden. Aus diesem Grund handelte es sich bei dem Ciglitazon-induzierten Zelltod in den Jurkat P⁺ Zellen per Definition nicht um Apoptose, sondern um Nekrose. Rosiglitazon, welches gegenwärtig als Anti-Diabetikum eingesetzt wird [138], führte dahingegen bei keiner getesteten Konzentration zu einem nachweisbaren Zelltod nach einer 4-stündigen Inkubation. Dies konnte auch in Ratten-Hepatoma Zellen nachgewiesen werden [139]. Arbeiten verschiedener Gruppen, die sich ebenfalls mit den cytotoxischen Wirkungen der TZDs beschäftigen, weisen auf das Mitochondrium als primäres Ziel der TZDs hin. In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch TZDs inhibiert wird [58, 61, 62, 137, 139, 140] und dadurch PPAR γ -unabhängige Effekte verursacht werden. Daher habe ich mich auf die Untersuchung der Wirkung der TZDs auf die mitochondriale Atmungskette konzentriert.

5.2.3 Die Wirkung von TZDs auf die mitochondriale Atmungskette

Submitochondriale Partikel, die so genannten SMPs, wurden als zellfreies Testsystem gewählt, um unspezifische Effekte, wie sie in permeabilisierten Zellen als optionales Testsystem auftreten können, zu vermeiden. Die bereits beschriebene Hemmung des Komplexes I durch TZDs [61, 62], konnte hierbei bestätigt werden, wobei Ciglitazon den stärksten Komplex I-Inhibitor darstellte, gefolgt von Troglitazon und Rosiglitazon. Von den hier getesteten TZDs konnten Ciglitazon und Troglitazon im Gegensatz zu Rosiglitazon auch den Komplex II hemmen. Dies widerspricht den Daten von Scatena et al. [61], die keinen Einfluss der TZDs auf die Succinat-Dehydrogenase, d. h. die Komplex II-Aktivität

identifizieren konnten. Eventuell liegt das an den unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Komplex II-Aktivität (SMPs im Vergleich zu permeabilisierten Zellen in der Scatena-Studie). O'Donnell et al. konnten bereits zeigen, dass zur eindeutigen Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität (d. h. Komplex II-Aktivität) unbedingt isolierte Mitochondrien verwendet werden müssen, da die bei der Verwendung permeabilisierter Zellen vorhandenen cytosolischen Proteine zu einer artifiziellen Reduktion von Elektronenakzeptoren führen [141]. Dies wurde in dem von mir verwendeten Testsystem der SMPs gewährleistet, da sie aus bereits aufgereinigten Mitochondrien hergestellt wurden. Die Komplex II-Aktivität wurde zum einen über die Messung der Succinat-Oxidase-Aktivität, bei der die Komplexe III und IV involviert sind, bestimmt und zum anderen über die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität, die den spezifischeren Nachweis darstellte. Bei dieser Nachweismethode überträgt der Komplex II Elektronen auf das zur mitochondrialen Atmungskette gehörende Ubiquinon. Das dadurch reduzierte Ubiquinon wird wiederum reoxidiert durch DCIP, welches im reduzierten Zustand photometrisch nachgewiesen und als Maß für die Komplex II-Aktivität angenommen wurde. Die Reduktion des DCIP ist allerdings unspezifisch und kann daher nicht komplett mit der Komplex II-katalysierten Reduktion des Ubiquinon gleichgesetzt werden. Diesen Zusammenhang konnte man daran erkennen, dass der spezifische Komplex II-Inhibitor TTFA in manchen Experimenten die Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität nur auf eine basale Hintergrundaktivität reduzieren konnte, die bis zu maximal 10% der Gesamtaktivität betrug. Somit kann eventuell der Unterschied hinsichtlich der benötigten Konzentration an Ciglitazon bzw. Troglitazon zur Hemmung der Komplex II-Aktivität, basierend auf der Bestimmung der Succinat-Oxidase-Aktivität im Vergleich zu der Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase-Aktivität, erklärt werden. Trotzdem konnte bei beiden Nachweismethoden eine eindeutige konzentrationsabhängige Hemmung der Komplex II-Aktivität durch Ciglitazon und Troglitazon festgestellt werden, wohingegen Rosiglitazon hierbei keine inhibitorische Wirkung zeigte.

5.2.4 Auswirkungen der Hemmung der Komplexe I und II auf den Zelltod in Jurkat P⁺ Zellen

Um nun zu überprüfen, welche Auswirkungen die mittels SMP festgestellte Hemmung der Komplexe I und II durch Ciglitazon bzw. Troglitazon hinsichtlich des Zelltodes in Jurkat P⁺ Zellen hat, wurden diese mit etablierten Komplex I- und II-Inhibitoren (Komplex I: Rotenon [110], Komplex II: TTFA [142, 143]) inkubiert. Die Hemmung des Komplexes I durch

Rotenon führte lediglich zu einer sehr geringen Induktion des Zelltodes nach 4 h und bestätigt damit Studien in HL-60 Zellen, bei denen Rotenon erst nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer signifikanten Induktion des Zelltodes führte [121, 144]. Dadurch kann auch die ausbleibende Zelltod-Induktion durch Rosiglitazon erklärt werden, welches im Vergleich zu Rotenon einen schwächeren Komplex I-Inhibitor darstellt und somit nach 4 h ebenfalls kein Zelltod zu erwarten war. Interessanterweise führte jedoch die alleinige Hemmung des Komplexes II durch TTFA in Jurkat P⁺ Zellen bereits zu einer signifikanten Induktion des Zelltodes nach 4 h Inkubation. Hinweise auf diese potentielle Rolle des Komplexes II bei der Zelltod-Induktion lieferten Studien in humanen Neuroblastom-Zellen, bei denen Malonat, ebenfalls ein potenter Inhibitor des Komplexes II, zu einer schnellen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führte [145]. Somit ist die Ciglitazon- und Troglitazon-bedingte Hemmung des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette die wahrscheinliche Ursache der Zelltod-Induktion. Hinzu kommt allerdings, dass Ciglitazon und Troglitazon neben dem Komplex II auch sehr effektiv den Komplex I hemmten. Dieser Effekt wurde durch die Verwendung der Kombination aus Rotenon und TTFA in Jurkat P⁺ Zellen imitiert. Dabei stellte sich heraus, dass die TTFA-bedingte, d. h. Komplex II-Hemmung-verursachte Zelltodrate nochmals deutlich durch die simultane Gabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon erhöht werden konnte. Aufgrund des Annexin V-FITC/PI-Assays und der nachgewiesenen apoptotischen Zellkerne mittels DAPI-Färbung, handelte es sich hierbei um Apoptose als zugrunde liegende Form des Zelltodes. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die Ciglitazon- und Troglitazon-vermittelte Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette als Ursache für die Induktion des beobachteten Zelltodes angesehen werden konnte.

Im Gegensatz zu Troglitazon induzierte Ciglitazon allerdings Nekrose, welche nicht über die alleinige, Apoptose-induzierende Hemmung der Komplexe I und II erklärt werden konnte. Studien von Leist et al. zeigen, dass in Jurkat T-Zellen das intrazelluläre ATP-Level eine entscheidende Rolle spielt, ob nach einem Todes-Stimulus Apoptose oder Nekrose erfolgt [17]. Die Daten dieser Arbeitsgruppe belegen, dass eine Depletion des ATP-Gehaltes in Kombination mit einem apoptotischen Stimulus, eine Verschiebung der Apoptose zur Nekrose als Form des Zelltodes bewirkt. In Studien von Aleo et al. konnte bereits eine konzentrations- und zeitabhängige Verringerung des ATP-Gehaltes in Ratten-Linsen-Explantaten nach Ciglitazon-Inkubation nachgewiesen werden [146]. Diese Ciglitazon-induzierte Verringerung des ATP-Gehaltes konnte ich ebenso in den Jurkat P⁺ Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu bewirkte sowohl die Hemmung der Komplexe I und II, als

auch die Inkubation mit Troglitazon, keine signifikante Verringerung des ATP-Gehaltes. Dies stimmt mit Daten aus Studien in Hepatozyten überein [59]. Weiterhin konnte ich in Jurkat P⁺ Zellen zeigen, dass die Depletion des ATP-Gehaltes, zusammen mit der Inhibition der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette, zur Induktion der Nekrose anstatt Apoptose führte. Dies bekräftigte die Hypothese, dass die identifizierte Ciglitazon-vermittelte Hemmung der Komplexe I und II, zusammen mit der nachgewiesenen Verringerung des intrazellulären ATP-Gehaltes Nekrose induzierte, wohingegen Troglitazon, welches das ATP-Level nicht beeinflusste, zur Induktion der Apoptose führte.

5.2.5 Mögliche Mechanismen der Zelltod-Induktion nach Ciglitazon- bzw. Troglitazon-Inkubation

Die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette hat zwangsläufig die Produktion von ROS zur Folge, die eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose [121] und Nekrose [12] spielen. Auch in den Jurkat P⁺ Zellen konnte ich nach Inkubation mit den getesteten TZDs eine deutliche Produktion von ROS nachweisen, die somit als möglicher Todes-Stimulus in Frage kamen. Die Vorinkubation der Zellen mit den Antioxidantien Vitamin C und MnTBAP wirkte cytoprotektiv auf die Nekrose-Induktion infolge der Ciglitazon-Inkubation. Dies deutete darauf hin, dass die entstandenen ROS stark an dem Zelltod beteiligt waren. Darüber hinaus zeigte die Vorinkubation mit der Katalase einen signifikanten inhibitorischen Effekt hinsichtlich der Nekrose-Induktion. Somit spielt offensichtlich auch H₂O₂ eine Rolle. Da die Katalase jedoch nicht die Zellmembran passieren kann, muss angenommen werden, dass infolge der Ciglitazon-Inkubation H₂O₂ entsteht, welches in der Lage ist die Membran zu durchqueren und parakrin Nekrose zu verursachen. Diese Daten bestätigen nicht die Studien von Atarod und Kehrer et al. [120], bei denen Vitamin C sowie Katalase keinen Einfluss auf den Ciglitazon-induzierten Zelltod zeigten. MnTBAP wurde in deren Arbeit nicht verwendet. Mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede könnten die eingesetzten Konzentrationen sein, welche in deren Experimenten im Falle von Ciglitazon doppelt so hoch und bei Vitamin C 3-fach höher waren. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass weder MnTBAP noch Vitamin C oder Katalase die Induktion der Nekrose komplett inhibieren konnten. Dies deutet darauf hin, dass ROS und H₂O₂ zwar signifikant zur Induktion der Nekrose beitrugen, jedoch nicht den einzigen Todes-Stimulus darstellten. Dahingegen konnte die Troglitazon-vermittelte Apoptose nur zu einem geringen Teil auf die Produktion von ROS zurückgeführt werden. Die Vorinkubation mit Vitamin C bzw. MnTBAP konnte die Induktion der Apoptose durch Troglitazon zwar signifikant inhibieren, jedoch im Vergleich

zu deren cytoprotektiver Wirkung bei der Ciglitazon-induzierten Nekrose nur marginal. H_2O_2 spielte keine Rolle bei der Troglitazon-induzierten Apoptose. Somit wird deutlich, dass ein weiterer, nicht identifizierter Mechanismus zusätzlich zur Induktion des Zelltodes beitragen muss.

Da Rosiglitazon als Komplex I-Inhibitor identifiziert wurde, war eine Produktion von ROS nach Rosiglitazon-Inkubation in Jurkat P^+ Zellen zu erwarten. Trotz der nachgewiesenen ROS, die potentiell Apoptose induzieren können, war jedoch zumindest nach 4 h kein signifikanter Zelltod nachweisbar. Die Produktion von ROS muss jedoch auch nicht zwangsläufig zur Induktion des Zelltodes führen. Dies konnte ebenfalls in Jurkat T-Zellen durch Atarod und Kehrer et al. gezeigt werden [120], in deren Studie die Inkubation mit 100 μ M WY14643, einem PPAR α Liganden, zu einer signifikanten ROS-Produktion, jedoch zu keinem nachweisbaren Zelltod bis zu 48 h nach Stimulation führte. Dies könnte eventuell durch die Kulturbedingungen erklärt werden, denn es ist bekannt, dass dem Kulturmedium zugesetztes FCS Überlebens-fördernde Faktoren enthält, die Zellen vor Apoptose schützen können [147]. Daher ist es denkbar, dass die Sensitivität gegenüber der Apoptose durch die vorhandene FCS-Konzentration und die Intensität des apoptotischen Stimulus beeinflusst werden könnte. Auch eine gesteigerte Aktivität intrazellulärer, antioxidativer Systeme, die den Abbau von ROS bewirken, könnte in Frage kommen. Jedenfalls trägt die TZD-induzierte ROS-Produktion mit Sicherheit zur Induktion des Zelltodes bei. Jedoch stellt offensichtlich die durch Ciglitazon- und Troglitazon-vermittelte Hemmung des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette den entscheidenden Todes-Stimulus dar, wobei der zugehörige Signalweg noch nicht identifiziert werden konnte.

Die von mir erhobenen Daten sind in Abb. 29 nochmals schematisch dargestellt und zeigen, dass die PPAR γ -unabhängigen, cytotoxischen Effekte der TZDs hinsichtlich ihres Potentials zur Zelltod-Induktion, als auch die Art des ausgelösten Zelltodes, trotz ihrer sehr ähnlichen chemischen Struktur, sehr unterschiedlich sein können. Dies könnte somit auch erklären, warum gewisse Nebenwirkungen nur bei bestimmten Verbindungen der TZD-Klasse auftreten, wie z. B. die lebertoxische Wirkung von Troglitazon, welche bei Rosiglitazon nicht zu beobachten ist [54, 55]. Allerdings führt der Einsatz von TZDs, bei einer vorliegenden PPAR γ -Expression, auch zu einer Aktivierung von PPAR γ , welche in aktivierten T-Zellen, z. B. in T-Zellen septischer Patienten, wie in meiner Arbeit gezeigt, ebenfalls zur Induktion des Zelltodes führen kann. Somit ist bei der therapeutischen Anwendung von TZDs eine Überlappung von PPAR γ -unabhängigen und -abhängigen Effekten sehr wahrscheinlich. Hierbei entscheidet sicherlich die *in vivo* tatsächlich wirkende Konzentration, welcher Effekt

überwiegt. Aus diesem Grund sind genaue Kenntnisse unter welchen Bedingungen TZD-induzierte PPAR γ -unabhängige Signalwege auftreten und deren Folgen sehr wichtig. Da TZDs jedoch selektive PPAR γ -Liganden darstellen, müssen zur Entwicklung TZD-basierter Therapien auch sämtliche physiologischen und pathophysiologischen Konsequenzen einer PPAR γ -Aktivierung *in vivo* bekannt sein.

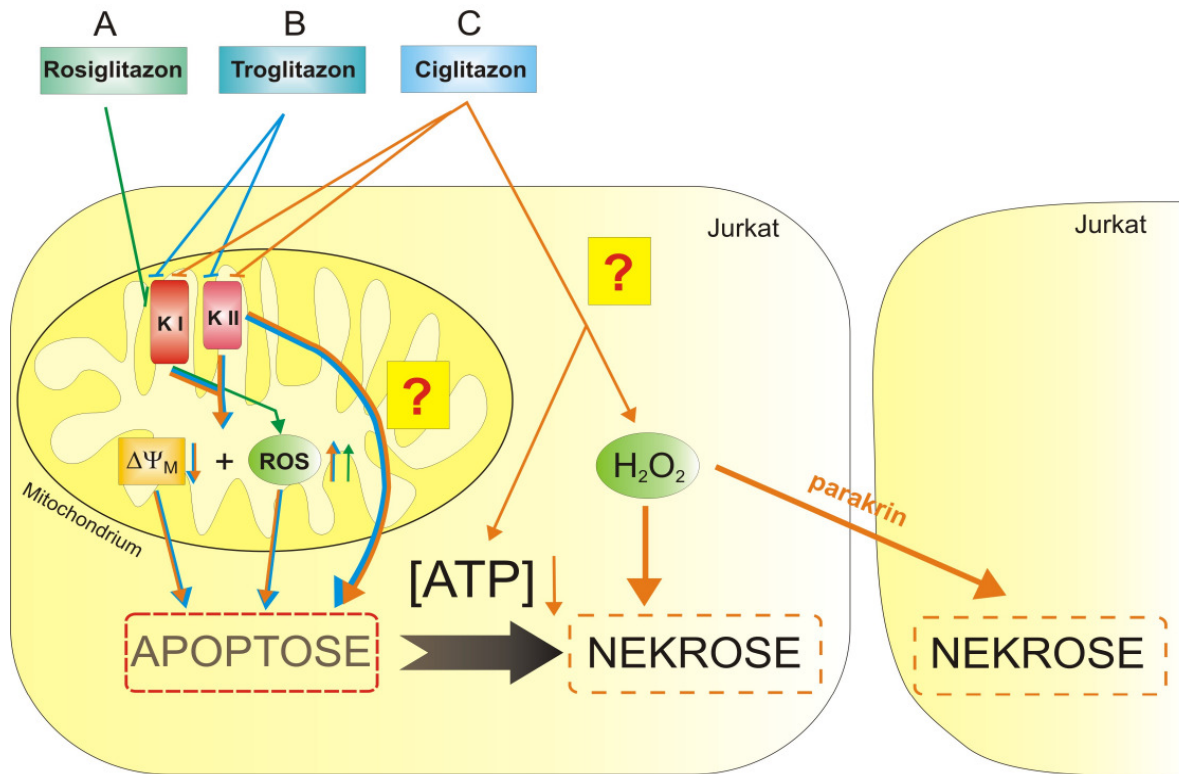


Abb. 29: Zusammenfassung der TZD-vermittelten, PPAR γ -unabhängigen Effekte durch die TZDs Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon. (A) Die Inkubation von Rosiglitazon für 4 h führt zur Hemmung des Komplexes I sowie zur Produktion von ROS in Jurkat (grüne Pfeile). Eine Induktion des Zelltodes bleibt jedoch aus. (B) Die Inkubation mit Troglitazon führt dahingegen zur Hemmung der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette, welche zur ROS-Produktion führt. Ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) als ein Kennzeichen der Apoptose ist nachweisbar (blaue Anteile der Pfeile). Einen weiteren elementaren Todes-Stimulus stellt die Hemmung des Komplexes II per se da, allerdings auf noch nicht geklärtem Signalweg. (C) Analog zur Troglitazon-Inkubation bewirkt die 4-stündige Ciglitazon-Inkubation die Hemmung der Komplexe I und II, welche zur ROS-Produktion führt, die maßgeblich an der Induktion des Zelltodes, der durch den Zusammenbruch des $\Delta\Psi_M$ nachweisbar ist, beteiligt ist (orangene Anteile der Pfeile). Im Gegensatz zu Troglitazon führt Ciglitazon auf unbekanntem Wegen zur Depletion des ATP-Gehaltes in der Zelle, wodurch Nekrose als zugrunde liegende Zelltod-Art eintritt. Weiterhin führt Ciglitazon zur Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches vermutlich in der gleichen Zelle, jedoch besonders in benachbarten Zellen, aufgrund von Diffusion deutlich zur Induktion der Nekrose beiträgt (Pfeile in orange).

In meiner Arbeit konnte ich PPAR γ -abhängige und -unabhängige Signalwege, die zum Zelltod von T-Zellen führen, zeigen. Die Kenntnis dieser neuen Mechanismen könnte dazu

beitragen, dass PPAR γ als möglicher Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Therapien zur Behandlung der Sepsis in Betracht gezogen wird. Falls dabei oder auch bei der Behandlung anderer Krankheiten TZDs zur Aktivierung von PPAR γ als potentielle Therapeutika zum Einsatz kommen sollten, könnten die in meiner Arbeit ebenso gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der PPAR γ -unabhängigen Signalwege zur Entwicklung und Optimierung TZD-basierter Therapien beitragen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Krankheit und eine der häufigsten Todesursachen auf Intensiv-Stationen. Die pathophysiologischen Zusammenhänge einer Sepsis sind sehr komplex und zudem noch recht wenig verstanden.

Die Hauptursache für die Schwere dieser Krankheit ist, dass die Regulation der Immunantwort völlig außer Kontrolle gerät. In der frühen, hyper-inflammatorischen Phase kommt es zu einer überschießenden Immunantwort mit massiven, systemischen Entzündungsreaktionen, in deren Folge der eigene Körper geschädigt wird. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zur hypo-inflammatorischen Phase, in der eine sehr stark supprimierte Immunantwort vorliegt, wodurch der Körper Pathogenen schutzlos ausgeliefert ist. Dabei scheint die Lymphopenie, d. h. die apoptotische Depletion von Lymphozyten, eine der Hauptursachen für die stark supprimierte Immunantwort in dieser Phase zu sein. Die Signalwege, die zur Apoptose der Lymphozyten während der Sepsis führen, sind noch nicht im Detail geklärt.

Aufgrund der Entdeckung von PPAR γ als wichtigem Regulator der Immunantwort, stellt dieses Liganden-gesteuerte Protein eventuell einen therapeutisch interessanten Ansatzpunkt dar. Die anti-inflammatorische Wirkung von PPAR γ , durch die Hemmung pro-inflammatorischer Signalwege, könnte in der hyper-inflammatorischen Phase von Vorteil sein. Jedoch kann die Aktivierung von PPAR γ auch Apoptose in aktivierten T-Zellen induzieren, welche zur Lymphopenie und daher zur Suppression des Immunsystems in der hypo-inflammatorischen Phase beitragen würde. Deshalb war die Klärung der Frage, ob die PPAR γ -vermittelte Apoptose in T-Zellen zur Lymphopenie während der Sepsis beiträgt, ein Hauptziel meiner Arbeit, wobei ich Folgendes herausfinden konnte:

- In den Blutproben von Sepsis-Patienten konnte eine Lymphopenie nachgewiesen werden, wobei hauptsächlich die T-Helferzellen depletiert waren.
- T-Zellen aus dem peripheren Blut von Sepsis-Patienten wiesen eine stark erhöhte PPAR γ -mRNA-Expression auf, wodurch PPAR γ als möglicher pro-apoptotischer Faktor in Frage kam. In der Tat zeigten T-Zellen aus Sepsis-Patienten *in vitro* stark erhöhte Apoptoseraten infolge einer Liganden-vermittelten PPAR γ -Aktivierung.
- Durch Reporteranalysen konnte ich eine Aktivierung von PPAR γ durch das Plasma von Sepsis-Patienten zeigen, welche das Vorliegen eines oder mehrerer potentieller PPAR γ -Liganden im Plasma, d. h. *in vivo* nahe legte. Dies wurde dadurch bestätigt,

dass das Plasma von Sepsis-Patienten in Jurkat T-Zellen PPAR γ aktivierte und zur Induktion der PPAR γ -vermittelten Apoptose führte.

- Zur Verifizierung der im Zellkultur-Modell erhaltenen Daten wollte ich ein Maus-Sepsis-Modell etablieren, bei dem PPAR γ spezifisch in T-Zellen ausgeschaltet sein sollte. Diese, als Ick-Cre;PPAR $\gamma^{fl/fl}$ bezeichnete, konditionelle PPAR γ -knock-out-Maus konnte ich züchten, jedoch kann noch keine klare Aussage über die Effizienz der PPAR γ -Deletion in den T-Zellen getroffen werden. Hierfür muss eine weitere Charakterisierung der Maus erfolgen.

Basierend auf den bisherigen Daten könnte somit die Aktivierung von PPAR γ in T-Zellen, durch im Plasma vorliegende PPAR γ -Liganden, zur nachgewiesenen Lymphopenie während der Sepsis beitragen. Diese Befunde legen eine Hemmung von PPAR γ in T-Zellen vor allem in der hypo-inflammatorischen Phase als potentiellen Therapie-Ansatz nahe.

Aufgrund der anti-inflammatorischen Wirkung von PPAR γ könnte auch dessen gezielte Aktivierung in der frühen hyper-inflammatorischen Phase therapeutisch interessant sein. Hierfür kämen die Thiazolidindione (TZDs) in Frage, welche als PPAR γ -Aktivatoren bereits bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ-2 zum Einsatz kommen. Da diese jedoch auch auf PPAR γ -unabhängigen Wegen den Zelltod in T-Zellen induzieren können, war es essentiell die dafür verantwortlichen Signalwege zu klären. Daher charakterisierte ich die TZD-vermittelten, PPAR γ -unabhängigen cytotoxischen Signalwege. Dabei konnte ich Folgendes feststellen:

- Durch die Verwendung eines geeigneten Jurkat-Klons (Jurkat P⁻), konnte ich gezielt die PPAR γ -unabhängigen cytotoxischen Effekte durch die TZDs Ciglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon untersuchen. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes bereits nach 4 h durch Ciglitazon und Troglitazon, wohingegen Rosiglitazon keinen Einfluss auf den Zelltod hatte.
- Bei der Charakterisierung des Zelltodes konnte ich Apoptose nach Troglitazon- und Nekrose nach Ciglitazon-Inkubation nachweisen. Die Inkubation der TZDs führte zur Produktion von ROS in den Jurkat P⁻ Zellen. Die gebildeten ROS spielen eine Rolle bei der Induktion des Zelltodes, da die Vorinkubation mit den Antioxidantien MnTBAP und Vitamin C bei der Ciglitazon-induzierten Nekrose und zum Teil bei der Troglitazon-induzierten Apoptose eine cytoprotektive Wirkung zeigten. Darüber

hinaus scheint die Inkubation mit Ciglitazon zur Produktion von Wasserstoffperoxid zu führen, das parakrin Nekrose induziert, da die Katalase die Nekroserate nach Ciglitazon-Inkubation reduzierte.

- Als Quelle der gebildeten ROS kamen die Mitochondrien in Frage. Durch Studien in SMPs konnte ich zeigen, dass die getesteten TZDs den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette inhibierten, während nur Ciglitazon und Troglitazon zusätzlich den Komplex II hemmen konnten.
- Durch den Einsatz synthetischer Inhibitoren für den Komplex I (Rotenon) und Komplex II (TTFA) für 4 h in Jurkat P⁺ Zellen zeigte sich, dass die alleinige Hemmung des Komplexes I sich nur marginal cytotoxisch auswirkte, wohingegen die Komplex II-Hemmung sowie die kombinatorische Hemmung der Komplexe I und II sehr deutlich zur Induktion des Zelltodes führte, welcher als Apoptose identifiziert werden konnte. Somit beruht die Zelltod-Induktion nach Ciglitazon und Troglitazon hauptsächlich auf der Hemmung des Komplexes II.
- In Jurkat P⁺ Zellen führte die Verringerung des ATP-Gehaltes in Kombination mit der Hemmung der Komplexe I und II zur Induktion der Nekrose an Stelle von Apoptose. Da die Ciglitazon-Inkubation ebenso zur Depletion des ATP-Gehaltes führte, erklärt dies auch die Nekrose-Induktion nach Ciglitazon, wohingegen Troglitazon den ATP-Gehalt nicht beeinflusste und daher Apoptose induzierte.

TZDs können somit auch auf PPAR γ -unabhängigen Wegen Apoptose bzw. sogar Nekrose in T-Zellen auslösen. Dabei zeigt sich, dass TZDs, trotz ihrer sehr ähnlichen chemischen Struktur, unterschiedlich wirken können. Die von mir identifizierten Mechanismen müssen berücksichtigt werden, wenn TZDs als potentielle Therapeutika zur Aktivierung von PPAR γ , wie z. B. in der frühen hyper-inflammatorischen Phase der Sepsis, in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus könnte dieses Wissen zu einem besseren Verständnis eventuell auftretender Nebenwirkungen bei bereits eingesetzten TZD-basierten Therapien, wie z. B. bei der Diabetes mellitus Typ-2, beitragen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
2. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
3. Xu, G. and Y. Shi, *Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis*. Cell Res, 2007(doi: 10.1038/cr.2007.52).
4. Cheng, E.H., et al., *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
5. Lindsten, T., et al., *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1389-99.
6. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
7. Duckett, C.S., et al., *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. Embo J, 1996. **15**(11): p. 2685-94.
8. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
9. Devadas, S., et al., *Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 237-47.
10. Hildeman, D.A., et al., *Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 735-44.
11. Ferraro-Peyret, C., et al., *Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4805-10.
12. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 416-23.
13. Goossens, V., et al., *Redox regulation of TNF signaling*. Biofactors, 1999. **10**(2-3): p. 145-56.
14. Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1477-85.
15. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.

16. Holler, N., et al., *Development of improved soluble inhibitors of FasL and CD40L based on oligomerized receptors*. J Immunol Methods, 2000. **237**(1-2): p. 159-73.
17. Leist, M., et al., *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
18. Zhang, X. and H.A. Young, *PPAR and immune system--what do we know?* Int Immunopharmacol, 2002. **2**(8): p. 1029-44.
19. Lazar, M.A., *PPAR gamma, 10 years later*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 9-13.
20. Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli, *Transcriptional regulation of metabolism*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 465-514.
21. Chawla, A., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation*. Endocrinology, 1994. **135**(2): p. 798-800.
22. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
23. von Knethen, A. and B. Brune, *PPARgamma--an important regulator of monocyte/macrophage function*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003. **51**(4): p. 219-26.
24. Wang, P., et al., *Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(4): p. 803-12.
25. Bodles, A.M., et al., *Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue*. J Lipid Res, 2006. **47**(9): p. 2080-8.
26. Tautenhahn, A., B. Brune, and A. von Knethen, *Activation-induced PPARgamma expression sensitizes primary human T cells toward apoptosis*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(5): p. 665-72.
27. Padilla, J., E. Leung, and R.P. Phipps, *Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists*. Clin Immunol, 2002. **103**(1): p. 22-33.
28. Chen, Y.C., S.C. Shen, and S.H. Tsai, *Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1743**(3): p. 291-304.
29. Mukherjee, R., et al., *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, 1997. **272**(12): p. 8071-6.
30. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Nature, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
31. Daynes, R.A. and D.C. Jones, *Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 748-59.
32. Nicholson, A.C., et al., *Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 224-8.
33. Glass, C.K. and S. Ogawa, *Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 44-55.
34. Kodera, Y., et al., *Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators.* J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33201-4.
35. Li, M., G. Pascual, and C.K. Glass, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4699-707.
36. von Knethen, A., M. Soller, and B. Brune, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and sepsis.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(1): p. 19-25.
37. Desreumaux, P., et al., *Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies.* J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 827-38.
38. von Knethen, A., et al., *PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages.* J Cell Biol, 2007. **176**(5): p. 681-94.
39. Johann, A.M., et al., *Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst.* Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1533-40.
40. Pascual, G., et al., *A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma.* Nature, 2005. **437**(7059): p. 759-63.
41. Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans, *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4312-7.

42. Kliewer, S.A., et al., *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4318-23.
43. Kliewer, S.A., et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-9.
44. Forman, B.M., et al., *15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma*. Cell, 1995. **83**(5): p. 803-12.
45. Nagy, L., et al., *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. Cell, 1998. **93**(2): p. 229-40.
46. Von Knethen, A. and B. Brune, *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2619-26.
47. Patsouris, D., M. Muller, and S. Kersten, *Peroxisome proliferator activated receptor ligands for the treatment of insulin resistance*. Curr Opin Investig Drugs, 2004. **5**(10): p. 1045-50.
48. Rangwala, S.M. and M.A. Lazar, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(6): p. 331-6.
49. Kemnitz, J.W., et al., *Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure, in obese, insulin-resistant rhesus monkeys*. Diabetes, 1994. **43**(2): p. 204-11.
50. Gastaldelli, A., et al., *Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E871-83.
51. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
52. Rubenstrunk, A., et al., *Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(8): p. 1065-81.
53. Henke, B.R., et al., *N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. I. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents*. J Med Chem, 1998. **41**(25): p. 5020-36.
54. Watkins, P.B. and R.W. Whitcomb, *Hepatic dysfunction associated with troglitazone*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 916-7.

55. Lebovitz, H.E., M. Kreider, and M.I. Freed, *Evaluation of liver function in type 2 diabetic patients during clinical trials: evidence that rosiglitazone does not cause hepatic dysfunction*. Diabetes Care, 2002. **25**(5): p. 815-21.
56. Tolman, K.G., *Thiazolidinedione hepatotoxicity: a class effect?* Int J Clin Pract Suppl, 2000(113): p. 29-34.
57. Feinstein, D.L., et al., *Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?* Biochem Pharmacol, 2005. **70**(2): p. 177-88.
58. Bova, M.P., et al., *Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells*. Toxicol Lett, 2005. **155**(1): p. 41-50.
59. Haskins, J.R., et al., *Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes*. Arch Toxicol, 2001. **75**(7): p. 425-38.
60. Perez-Ortiz, J.M., et al., *Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8976-85.
61. Scatena, R., et al., *Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(3): p. 967-73.
62. Brunmair, B., et al., *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1052-9.
63. Pershadsingh, H.A., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: therapeutic target for diseases beyond diabetes: quo vadis?* Expert Opin Investig Drugs, 2004. **13**(3): p. 215-28.
64. Clark, R.B., et al., *The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1364-71.
65. Harris, S.G. and R.P. Phipps, *The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1098-105.
66. Harris, S.G. and R.P. Phipps, *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, 2002. **105**(1): p. 23-34.
67. Wang, Y.L., et al., *Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival.* J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31781-8.
68. Yang, X.Y., et al., *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, 2000. **275**(7): p. 4541-4.
69. Marx, N., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells.* Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1168-78.
70. Marx, N., et al., *PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis.* Circ Res, 2002. **90**(6): p. 703-10.
71. Cunard, R., et al., *Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7530-6.
72. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
73. Chung, S.W., B.Y. Kang, and T.S. Kim, *Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor.* Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1169-79.
74. Harris, S.G. and R.P. Phipps, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) activation in naive mouse T cells induces cell death.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **905**: p. 297-300.
75. Nencioni, A., et al., *Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling.* J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5148-56.
76. Kanunfre, C.C., et al., *Ciglitizone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells.* Int Immunopharmacol, 2004. **4**(9): p. 1171-85.
77. Yamakawa-Karakida, N., et al., *Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity.* Cell Death Differ, 2002. **9**(5): p. 513-26.

78. Rossi, A., et al., *Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase*. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 103-8.
79. Kangas, A., D.W. Nicholson, and E. Holtta, *Involvement of CPP32/Caspase-3 in c-Myc-induced apoptosis*. *Oncogene*, 1998. **16**(3): p. 387-98.
80. Kim, K.Y., J.H. Ahn, and H.G. Cheon, *Apoptotic action of PPAR{gamma} activation in human non-small cell lung cancer is mediated via proline oxidase-induced ROS formation*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(3): p. 674-85.
81. Kim, S.H., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) induces cell death through MAPK-dependent mechanism in osteoblastic cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **215**(2): p. 198-207.
82. Li, M., et al., *Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **209**(2): p. 428-38.
83. Jung, J.Y., et al., *Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in troglitazone-induced osteoblastic cell death*. *Toxicology*, 2007. **234**(1-2): p. 73-82.
84. Kim, K.Y., S.S. Kim, and H.G. Cheon, *Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(5): p. 530-40.
85. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(2): p. 138-50.
86. Hunter, P., *Sepsis under siege: a new understanding of sepsis might lead to the development of therapies to treat septic shock*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(7): p. 667-9.
87. Bone, R.C., et al., *Sepsis syndrome: a valid clinical entity*. *Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group*. *Crit Care Med*, 1989. **17**(5): p. 389-93.
88. Bone, R.C., et al., *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*, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
89. Brun-Buisson, C., *The epidemiology of the systemic inflammatory response*. *Intensive Care Med*, 2000. **26 Suppl 1**: p. S64-74.
90. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
91. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(7): p. 1303-10.

92. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P.A. Ward, *The enigma of sepsis*. J Clin Invest, 2003. **112**(4): p. 460-7.
93. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P.A. Ward, *Novel strategies for the treatment of sepsis*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 517-24.
94. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 169-76.
95. Singh, S. and T.W. Evans, *Organ dysfunction during sepsis*. Intensive Care Med, 2006. **32**(3): p. 349-360.
96. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 813-22.
97. Joshi, V.D., D.V. Kalvakolanu, and A.S. Cross, *Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis*. FEBS Lett, 2003. **555**(2): p. 180-4.
98. Hotchkiss, R.S., et al., *Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 5110-8.
99. Hotchkiss, R.S., et al., *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1230-51.
100. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
101. Le Tulzo, Y., et al., *Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome*. Shock, 2002. **18**(6): p. 487-94.
102. Collin, M. and C. Thiemermann, *The PPAR-gamma ligand 15-deoxy(delta12,14) prostaglandin J2 reduces the liver injury in endotoxic shock*. Eur J Pharmacol, 2003. **476**(3): p. 257-8.
103. Kaplan, J.M., et al., *15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock*. Shock, 2005. **24**(1): p. 59-65.
104. Xu, J., Y. Fu, and A. Chen, *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(1): p. G20-30.
105. Siddiqui, A.M., et al., *The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Crit Care Med, 2006. **34**(7): p. 1874-82.

106. Cui, Y., et al., *Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility.* J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17830-5.
107. Tugwood, J.D., et al., *The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene.* Embo J, 1992. **11**(2): p. 433-9.
108. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *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, 1977. **19**(5): p. 621-6.
109. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
110. Okun, J.G., P. Lummen, and U. Brandt, *Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase).* J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2625-30.
111. Smith, A.L., *Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small scale.* Methods Enzymol., 1967. **10**: p. 81-86.
112. Thierbach, G. and H. Reichenbach, *Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain.* Biochim Biophys Acta, 1981. **638**(2): p. 282-9.
113. Brandt, U., H. Schagger, and G. von Jagow, *Purification of cytochrome-c oxidase retaining its pulsed form.* Eur J Biochem, 1989. **182**(3): p. 705-11.
114. Ayala, A., et al., *Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin.* Immunology, 1999. **97**(1): p. 45-55.
115. Gurnell, M., et al., *A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis.* J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5754-9.
116. Barak, Y., et al., *PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development.* Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 585-95.
117. Lee, P.P., et al., *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival.* Immunity, 2001. **15**(5): p. 763-74.
118. Cippitelli, M., et al., *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, 2003. **170**(9): p. 4578-92.
119. Yang, Y.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cause growth arrest and apoptosis in human ovarian carcinoma cell lines.* Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(2): p. 418-25.
120. Atarod, E.B. and J.P. Kehrer, *Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines.* Free Radic Biol Med, 2004. **37**(1): p. 36-47.
121. Pelicano, H., et al., *Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism.* J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37832-9.
122. Dolgachev, V., et al., *Reactive oxygen species generation is independent of de novo sphingolipids in apoptotic photosensitized cells.* Exp Cell Res, 2003. **288**(2): p. 425-36.
123. Huang, H.L., et al., *DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation.* Oncogene, 2003. **22**(50): p. 8168-77.
124. Kwon, J., S. Devadas, and M.S. Williams, *T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and lck serine phosphorylation.* Free Radic Biol Med, 2003. **35**(4): p. 406-17.
125. Roth, G., et al., *Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 840-6.
126. Yang, X.Y., et al., *Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands.* J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3973-8.
127. Chinetti, G., et al., *Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25573-80.
128. Shankaranarayanan, P. and S. Nigam, *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, 2003. **170**(2): p. 887-94.

129. Satoh, T., et al., *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*, 2002. **21**(14): p. 2171-80.
130. Liu, J., et al., *Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells*. *Int Immunopharmacol*, 2001. **1**(1): p. 63-74.
131. Jones, D.C., X. Ding, and R.A. Daynes, *Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(9): p. 6838-45.
132. Shibata, T., et al., *15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 10459-66.
133. Gilroy, D.W., et al., *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties*. *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 698-701.
134. Jones, J.R., et al., *Generation and functional confirmation of a conditional null PPARgamma allele in mice*. *Genesis*, 2002. **32**(2): p. 134-7.
135. Akiyama, T.E., et al., *Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(8): p. 2607-19.
136. Willson, T.M., et al., *The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones*. *J Med Chem*, 1996. **39**(3): p. 665-8.
137. Tirmenstein, M.A., et al., *Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function*. *Toxicol Sci*, 2002. **69**(1): p. 131-8.
138. Yki-Jarvinen, H., *Thiazolidinediones*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(11): p. 1106-18.
139. Narayanan, P.K., et al., *Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment*. *Cytometry A*, 2003. **52**(1): p. 28-35.
140. Dello Russo, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5828-36.
141. O'Donnell, V.B., S. Spycher, and A. Azzi, *Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in tumour-necrosis-factor-alpha-mediated apoptosis: role for*

- lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 1): p. 133-41.
142. Ingledew, W.J. and T. Ohnishi, *The probable site of action of thenolytrifluoroacetone on the respiratory chain*. Biochem J, 1977. **164**(3): p. 617-20.
143. Zhang, J.G. and M.W. Fariss, *Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(4): p. 751-4.
144. Li, N., et al., *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8516-25.
145. Fernandez-Gomez, F.J., et al., *Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(4): p. 528-37.
146. Aleo, M.D., C.M. Doshna, and K.A. Navetta, *Ciglitazone-induced lenticular opacities in rats: in vivo and whole lens explant culture evaluation*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(3): p. 1027-33.
147. Iglesias, J., et al., *Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. F711-22.

-ANHANG-

A1 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

Prof. Dr. Bernhard Brüne für die Vergabe des Themas, die Überlassung des Arbeitsplatzes und die stete Bereitschaft zur Diskussion sowie für die konstruktive Kritik.

HD Dr. Andreas von Knethen für die intensive Betreuung und hervorragende moralische Unterstützung in wissenschaftlicher, als auch in sportlicher Hinsicht, denn ohne ihn wäre das Lauftraining, als sehr guter Ausgleich zur Laborarbeit, vermutlich wesentlich dürftiger ausgefallen.

Meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion seelisch, moralisch und nicht zuletzt finanziell unterstützt haben.

Meiner Freundin Gudi, sowie meinen Brüdern und deren Familien, die mich alle auf ihre besondere Weise unterstützt haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Allen Labormitgliedern, für die tolle Zusammenarbeit, sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Lösung wissenschaftlicher Probleme und für die unzähligen Motivations-Fördernden Gespräche u. a. auf dem Balkon.

Meinen Freunden, die mich auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

A2 Curriculum vitae

Name: Mathias Soller
Geburtsdatum: 19. Oktober 1978
Geburtsort: Worms
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Rebgartenstraße 19, 67551 Worms
Telefon: 06241 33450, 0176 21238241
Email: mathias.soller@freenet.de

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1985-1989 Grundschule Worms Wiesoppenheim
1989-1998 Abitur, Eleonoren-Gymnasium, Worms
1998-1999 Freiwilliges soziales Jahr als Sanitäter am DRK-Berufsbildungswerk-
Worms
1999-2004 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
2004 Diplom im Fach Biologie, Universität Kaiserslautern, Betreuer: HD Dr.
Andreas von Knethen und Prof. Dr. Bernhard Brüne
2004-2005 Doktorand am Institut für Zellbiologie der Universität Kaiserslautern,
Betreuer: HD Dr. habil. Andreas von Knethen und Prof. Dr. Bernhard
Brüne
2005 Forschungsaufenthalt am Laboratory of Genetics and Physiology,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, Betreuer: Dr.
Lothar Hennighausen
Seit 2005 Doktorand am Institut für Biochemie I - Pathobiochemie, Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Betreuer:
HD Dr. Andreas von Knethen und Prof. Dr. Bernhard Brüne
November 2007 Ende des Promotionsverfahrens

A3 Publikationen

- Soller, M., Tautenhahn, A., Brüne, B., Zacharowski, K., John, S., Link, H. and von Knethen, A., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to T lymphocyte apoptosis during sepsis*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(1): p. 235-43.
- Soller, M., Dröse, S., Brandt, U., Brüne, B. and von Knethen, A., *Mechanism of thiazolidinedione-dependent cell death in Jurkat T cells*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(6): p. 1535-44.

Andere Publikationen:

- von Knethen, A., Soller, M., Tzieply, N., Weigert, A., Johann, AM., Jennewein, C., Köhl, R. and Brüne, B., *PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages*. J Cell Biol, 2007. **176**(5): p. 681-94.
- von Knethen, A., Soller, M. and Brüne, B., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(1): p. 19-25.

Posterbeiträge:

- Soller, M., Brüne, B., von Knethen, A., *T cell depletion in sepsis is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent apoptosis*, Archives of Pharmacology 2005, Abstracts of the 46th Spring Meeting: p. R14, 55.

A4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter und anderer Autoren habe ich entsprechend gekennzeichnet.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich weder bereits früher ein Promotionsverfahren an einer anderen Hochschule beantragt habe, noch die Dissertationsschrift vollständig oder in Teilen einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt wurde.

Frankfurt, den 05.11.2007