

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. H. Einsele**

**Abteilung für Molekulare Innere Medizin**

**Leiter der Abteilung: Professor Dr. Harald Wajant**

## **Mechanismen der Todesrezeptorinduzierten JNK-Aktivierung**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Barbara Klingler**

**aus Flensburg**

**Flensburg, Oktober 2014**



**Referent:** Professor Dr. Harald Wajant

**Korreferent:** Professor Dr. Christoph Otto

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 01.06.2015

**Die Promovendin ist Ärztin**

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1 Einleitung ..... 1**

1.1 Generelle Aspekte der Fas-Signaltransduktion .....	1
1.2 Fas und FasL - Aufbau und Struktur .....	2
1.3 Proapoptotische Funktionen von Fas.....	3
1.4 Die Rolle von Fas bei entzündlichen Prozessen.....	9
1.5 Nicht-apoptotische Signalwege von Fas.....	9
1.5.1 Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Fas .....	10
1.5.2 Die Aktivierung des JNK-Signalwegs.....	12
1.5.2.1 Bedeutung der JNK .....	12
1.5.2.2 Zusammenhang zwischen Fas und dem JNK-Signalweg.....	13
1.5.2.3 Zusammenhang zwischen Fas und den p38-MAPK- bzw. ERK1/2-Signalwegen .....	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	16

### **2 Material und Methoden..... 17**

2.1 Reagenzien für Kultivierung, Stimulation, Lyse von Zellen.....	17
2.2 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines Western Blots .....	18
2.3 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines IL8-ELISAs .....	19
2.4 Zelllinien.....	20
2.5 Pufferzusammensetzungen und Lösungen .....	21
2.6 Zellkultivierung .....	23
2.7 Stimulation der Zellen zur Durchführung eines Western Blots .....	23
2.8 Zellernte und Herstellung von Zelllysaten .....	24
2.9 Western Blotting.....	25
2.10 Bestimmung der Zellsterblichkeit im Kristallviolett (KV)-Zytotoxizitätstest	26
2.11 Messung der IL8-Produktion mittels ELISA.....	27

**3 Ergebnisse ..... 28**

3.1 Analyse der FasL-induzierten JNK-Aktivierung in Jurkatzellen ..... 28

3.2 Die FasL-induzierte JNK-Phosphorylierung in KB-Zellen korreliert mit der Apoptoseaktivität..... 30

3.3 FasL-induziert JNK-Aktivierung apoptoseunabhängig in Colo357 Bcl-xL Zellen ..... 32

3.4 Darstellung der Prozessierung von Caspase 8 und PARP in Colo357-Zellen ..... 35

3.5 Nachweis des Zusammenhangs zwischen der JNK-Aktivierung und der Produktion von Interleukin 8 bei Colo357 Bcl-xL Zellen..... 37

**4 Diskussion ..... 39**

4.1 Die JNK-Aktivierung erfolgt durch Fas und lässt sich durch Inhibierung von Caspase 8 partiell unterdrücken..... 39

4.2 Die JNK-Aktivierung durch FasL kann unabhängig vom Zelltod erfolgen..... 40

4.3 Die IL8-Produktion erfolgt mutmaßlich unabhängig von der JNK-Aktivität ..... 41

**5 Zusammenfassung..... 43**

**6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis..... 45**

6.1 Literaturverzeichnis ..... 45

6.2 Abbildungsverzeichnis ..... 50

## **1 Einleitung**

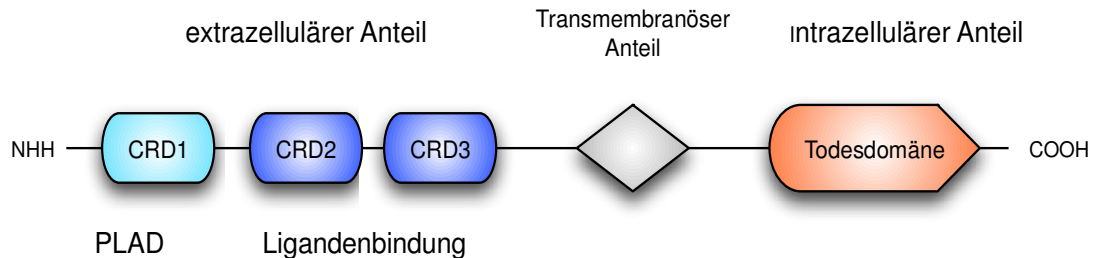
### 1.1 Generelle Aspekte der Fas-Signaltransduktion

In den Jahren bis 2004 hatte sich zunehmend gezeigt, dass der Rezeptor Fas (Apo-1/CD95) als Mitglied der Todesdomäne enthaltenden Untergruppe der TNF-Rezeptorfamilie, zu der auch der TNF (Tumor necrosis factor)-Rezeptor 1, der TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-Rezeptor 1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2, DR3 (death receptor 3), EDAR (ectodermal dysplasia receptor) und der p75NGFR (low affinity nerve growth factor receptor)<sup>1</sup> zählen, nicht nur proapoptotische Funktionen erfüllt. Zwar spielen diese bei der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität, dem AICD (activation-induced cell death), bei der Neoangiogenese und dem Überleben von Tumoren<sup>2</sup> sowie der Apoptose insbesondere von Zellen der Leber, des Pankreas und des Gehirns<sup>3</sup> eine entscheidende Rolle; dennoch kommt auch den Fas-vermittelten Funktionen jenseits des programmierten Zelltods eine große Bedeutung zu. Abhängig von den zellulären Voraussetzungen kann Fas auch die Einleitung einer nekrotischen Form des Zelltods bedingen<sup>2</sup>. Weiterhin wurden die Induktion der Proliferation von T-Zellen und Fibroblasten, die Regeneration bei traumatischen Leberschäden<sup>3</sup>, die Produktion von Chemokinen sowie die Reifung dendritischer Zellen und die Aussprossung von Nervenzellen<sup>2</sup> durch nicht-apoptotische Aktivierung des Fas-Systems beschrieben. Zudem wird Fas in großen Mengen von Zellen des Pankreas, des Dickdarms und des Herzens exprimiert, bei denen es ebenfalls eine nichtapoptotische Funktion erfüllt<sup>3</sup>. Unklar war jedoch zurzeit der Durchführung dieser Arbeit, wie diese Fas-Funktionen auf zellulärer Ebene induziert werden, zumal auch an den nicht-apoptotischen Fas-Signalwegen wesentliche Komponenten der Apoptose-signaltransduktion beteiligt sind<sup>2</sup>.

### 1.2 Fas und FasL - Aufbau und Struktur

Strukturell zählt man den 40 kDa, trimer organisierten FasL (Fas-Liganden) zu den Membranproteinen des Typs II. FasL wird bevorzugt auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Die membranständige Form des FasL kann auf zwei Wegen in eine lösliche Form gebracht werden: alternatives Splicen oder proteolytische Prozessierung<sup>7</sup>. Beide Formen können Fas-assoziierte Signalwege initialisieren, jedoch hat der lösliche FasL einen weitaus schwächeren Effekt als das membrangebundene Molekül<sup>8</sup>.

Fas wird als Typ I Membranprotein nahezu ubiquitär exprimiert. Es besteht aus einem extrazellulären Teil, der über drei cysteinreiche Domänen verfügt<sup>9</sup>, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulärem Teil mit der DD (death domain)<sup>10</sup>. Die DD setzt sich aus einer Sequenz von 80 Aminosäuren zusammen<sup>3</sup> und stellt mit der cysteinreichen Domäne ein gemeinsames Merkmal der Todesrezeptoren dar, findet sich aber auch zusätzlich in zytoplasmatischen Proteinen, die meist Komponenten des Apoptose-Signalwegs sind. DDs führen durch homotypische Interaktionen zu einer Homo- bzw. Heteromerisierung DD-enhaltender Proteine<sup>2</sup>. Beim aktivierten Fas bildet die DD die Bindungsstelle für das Todesdomäneadapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein), einer Komponente des apoptoseinduzierenden Fas-Rezeptorsignalkomplexes, der als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet wird. Natürlicherweise wird Fas durch den FasL aktiviert, Fas kann aber auch mit agonistischen Antikörpern wie Jo2, oder rekombinanten oligomeren Formen des FasL (FLAG-FasL + anti-FLAG AK; leucine zipper FasL, Fc-FasL) stimuliert werden. Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass diese künstlichen Liganden Apoptose in Zellen induzieren, bei denen der natürliche lösliche FasL keine effiziente Wirkung zeigt. Dies führte u. a. zu der Annahme, dass die Oligomerisierung von FasL-Trimeren, die durch die Fc-Domäne oder Antikörpervernetzung erreicht wird, diese Moleküle in Aggregate umwandelt, die ähnlich wie Membran-FasL wirken.



**Abb. 1: Schematische Darstellung von Fas.**

Am aminoterminalen Ende gelegen und unter Einbeziehung der CDR1 (Cystein-rich domain 1) befindet sich die PLAD (pre-ligand assembly domain), die eine ligandenunabhängige Präaggregation einzelner Fas-Rezeptoren möglich macht. An CDR2 und CDR3 findet die Bindung des FasL statt. Der intrazelluläre, carboxyterminal gelegene Todesdomänenabschnitt erlaubt nach Aktivierung die Rekrutierung anderer Komponenten des DISC.

### 1.3 Proapoptotische Funktionen von Fas

Im nichtaktiviertem Zustand liegt Fas in einer oligomeren, präaggregierten Form vor, bei der keine Signale generiert werden<sup>12</sup>. Dies wird vermittelt durch die extrazelluläre, N-terminal in einer cysteinreichen Region des Rezeptors liegende, sogenannte PLAD (pre-ligand assembly domain), die auch in einer Reihe anderer TNF-Rezeptorfamiliemitglieder gefunden wurde<sup>34</sup>. Durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor erfolgt eine Änderung der Struktur des Rezeptors, die PLAD-vermittelte, präaggregierte dimere Form von Fas wird durch die stabilere trimere Form, die zur Signaltransduktion notwendig ist, ersetzt<sup>34</sup>. Eine streng monomere Form des Fas-Rezeptors, wie beispielsweise in naiven oder aktivierten T<sub>4</sub>-Zellen, macht eine Apoptoseinduktion nahezu unmöglich<sup>34</sup>.

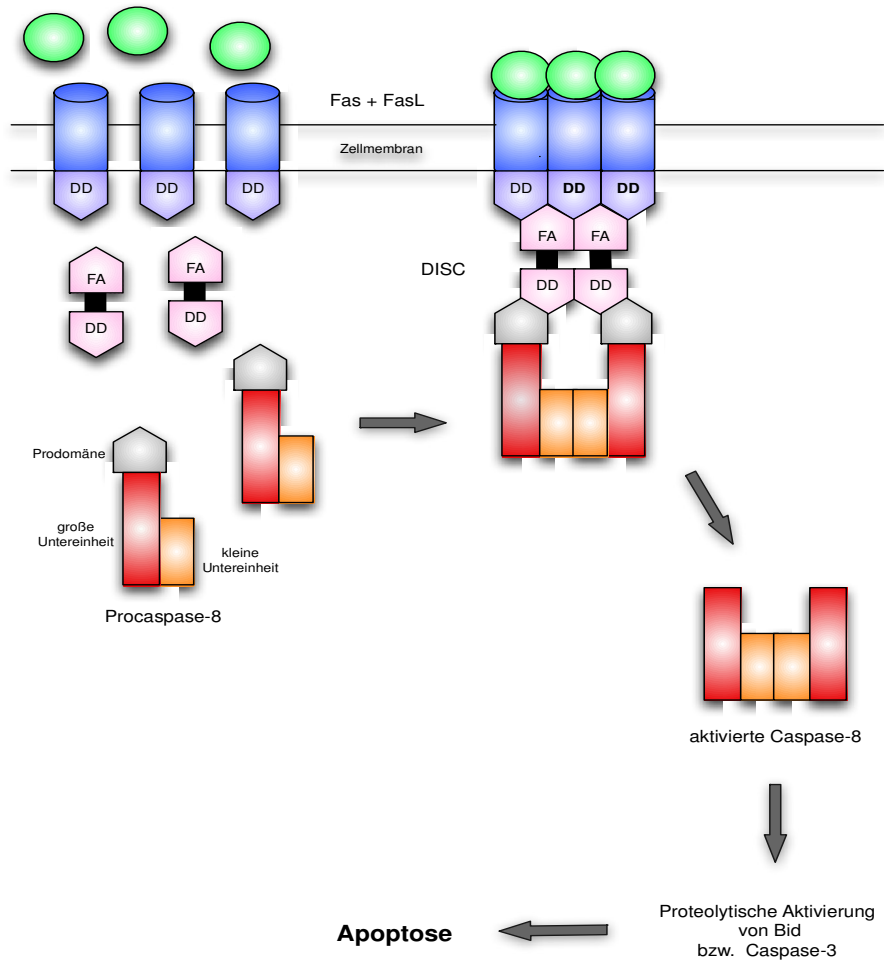
Die Induktion von Apoptose kann auf zwei prototypischen Wegen, dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg erfolgen<sup>13</sup>. Bei ersterem kommt es zu einer Anlagerung von FADD mit seiner C-terminalen DD an die DD von Fas sowie der Bindung von Procaspase 8 an den N-terminalen Teil von Fas-gebundenem FADD.

Dadurch bildet sich der DISC, bestehend aus Fas, FasL, FADD und Procaspase 8<sup>14</sup>. Im

DISC wird Procaspase 8 aktiviert; dies geschieht durch eine vorübergehende Bildung von Dimeren, der autokatalytischen Prozessierung dieser dimeren Caspase 8-Zwischenform und der Freisetzung reifer heterotetramerer Caspase 8-Moleküle, die aus einem initialen Caspase 8-Dimer hervorgehen<sup>15</sup>. Die aktive heterotetramere Caspase 8 (FLICE, *FADD-like interleukine 1 $\beta$ -converting enzyme*) prozessiert und aktiviert dann insbesondere Caspase 3, was schließlich zum Untergang der Zelle führt<sup>6,16</sup>.



### 1.3 Proapoptotische Funktionen von Fas



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Caspase 8-Aktivierung durch Fas.**

Durch Bindung des Fas-Liganden an Fas findet eine Aggregation von mehreren Rezeptor-Liganden-Komplexen statt, es kommt es zu einer Annäherung der intrazellulären Rezeptoranteile mit der Death Domain (DD). Durch Bindung von FADD an die DD entsteht der DISC, welcher wiederum die Bindung von zymogenen Caspase 8-Dimeren ermöglicht. Diese bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne und einer größeren sowie einer kleineren, C-terminal gelegenen Untereinheit<sup>33</sup>. Bei Kontakt findet die Trennung der Verbindungsabschnitte zunächst zwischen den Untereinheiten statt und führt im weiteren Verlauf zu einer Abspaltung der Prodomäne<sup>33</sup>. Auf diese Weise entsteht die stabile, aktive heterotetramere Form der Caspase 8, die aus dem DISC freigesetzt wird und durch die im weiteren Verlauf entweder die Aktivierung von Effektorcaspasen oder die Spaltung von Bid eingeleitet werden kann.

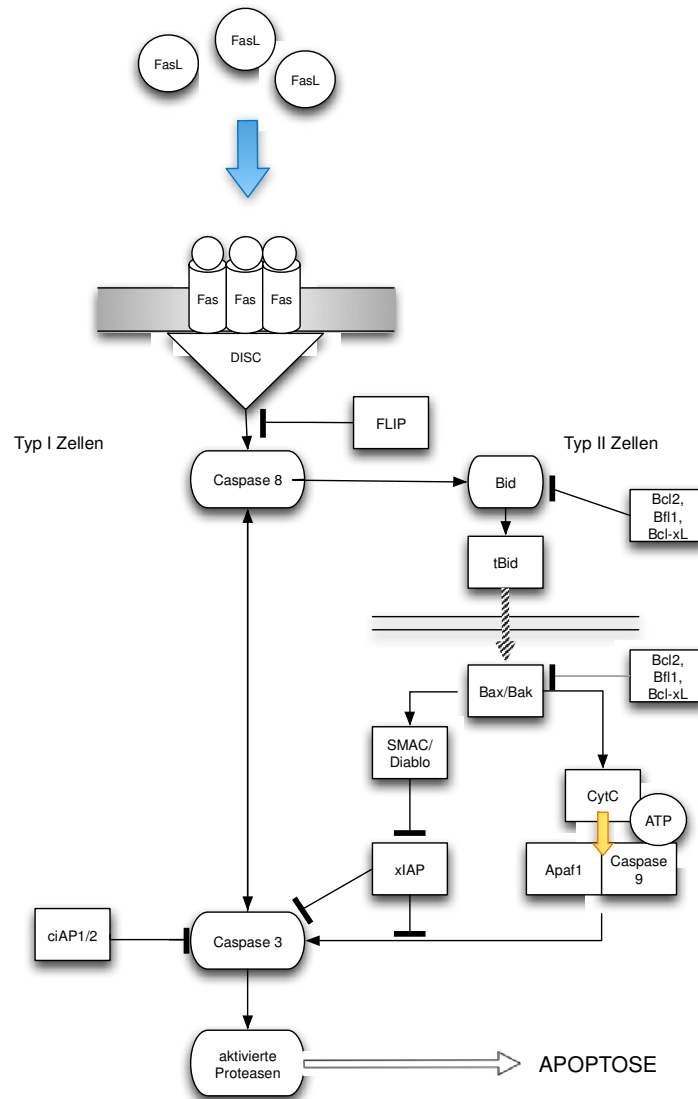
Der intrinsische Weg der Apoptose wird durch die Mitwirkung der Mitochondrien aktiviert und durch Mitglieder der Bcl2 Familie reguliert. Prinzipiell lässt sich die Bcl-2 Familie in pro- und antiapoptotisch wirksame Proteine untergliedern<sup>35</sup>. Zur proapoptotischen Gruppe zählen einerseits die „Multidomänenproteine“ Bax und Bak, die strukturell den Mitgliedern der antiapoptotischen Gruppe ähneln; von vier BH-Regionen sind die BH1-, BH2- und BH3-Region identisch<sup>36</sup>. In der zweiten Untergruppe der proapoptotischen Proteine befinden sich die BH3-only Proteine wie Bnip3, Nix/Bnip3L, Bid, Noxa, Puma und Bad; von den vier BH-Regionen besitzen sie ausschließlich die BH3-Region als gemeinsames strukturelles Merkmal<sup>38</sup>. Aus dieser Gruppe wird lediglich Bid durch Fas aktiviert, die übrigen Mitglieder durch eine Vielzahl anderer Signale. So setzt beispielsweise ein DNA-Schaden oder die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 die Apoptoseinduktion durch Noxa und Puma in Gange<sup>39,40</sup>, ein Mangel an Wachstumsfaktoren aktiviert Bad<sup>41,42</sup>. Hypoxie und azidotische Stoffwechselkonstellationen stimulieren Bnip3<sup>43,44</sup>, eine Zellhypertrophie Nix<sup>35</sup>. Eine cytoskeletale Alteration durch eine fehlerhafte Struktur der Mikrotubuli mit einer erhöhten Anzahl an Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert Bim<sup>45</sup>. Im weiteren Verlauf initialisieren die BH3-only Proteine schließlich die Apoptose durch Aktivierung von Bax und Bak<sup>35</sup>. Die antiapoptotische Gruppe beinhaltet Bcl-xL und Bcl2, diese weisen strukturell alle 4 BH-Regionen auf<sup>35</sup>. Es gibt Hinweise darauf, dass unter besonderen Umständen die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl2 Familie selbst zu Substraten von Caspasen werden, die Spaltprodukte übernehmen dann eine proapoptotische Funktion und ermöglichen die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium<sup>46,47</sup>.

Bei der Aktivierung des intrinsischen Weges durch Fas kommt es zu einer Spaltung von zytoplasmalem Bid durch Caspase 8. Das gespaltene Bid-Fragment wandert zu den Mitochondrien, wo es Bax und Bak aktiviert<sup>6,16</sup>. Dadurch kommt es zur Porenbildung in der äußeren mitochondriellen Membran und der Freisetzung von Cytochrom c, das gemeinsam mit ATP und Apaf1 (apoptosis promoting factor 1) Caspase 9 aktiviert und sich mit letzterem zu einem Apoptosom zusammenschließen<sup>16</sup>, das durch Aktivierung von Caspase 3 über eine positive Rückkopplung durch die retrograde Aktivierung von Caspase 8 zur Apoptose führt<sup>17</sup>. Parallel findet zudem die Aktivierung eines zweiten

Caspase-aktivierenden Signalwegs mitochondrialen Ursprungs über SMAC (small mitochondria-derived activator of caspases)/Diablo statt, der zur Inhibierung des antiapoptotischen Caspaseinhibitors xIAP führt.

Auf Basis der Unterscheidung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg lassen sich Zellen dem Typ-I oder Typ-II zuordnen. Bei Zellen vom Typ-I ist die Aktivierung des extrinsischen Pfades zur Apoptoseinduktion, z.B. durch den FasL, ausreichend um effizient Apoptose auszulösen. In Typ-II Zellen hingegen benötigt die Fas-vermittelte Apoptose zusätzlich den intrinsischen Weg zur Verstärkung des Apoptosesignals, das durch den initial aktivierten intrinsischen Weg bereit gestellt wird. Bei Typ-II-Zellen kommt es daher im Gegensatz zu den Zellen vom Typ-I, bei Expression von antiapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie wie Bcl-xL oder Bcl2 nicht zur Apoptoseinduktion, da die alleinige Caspase 3-Aktivierung direkt über die Caspase 8 nicht effizient genug erfolgt<sup>16</sup>.

### 1.3 Proapoptotische Funktionen von Fas



**Abb. 3: Fas-induzierte Apoptoseinduktion.**

Bindung des löslichen FasL an Fas führt zu einer Clusterbildung der Rezeptor/Liganden – Komplexe und intrazellulären Formierung des DISC. Typ II – Zellen benötigen zur suffizienten Apoptoseinduktion die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs über die Spaltung von Bid zu tBid. Nach Translokation in das Mitochondrium führt dies über die Bildung eines Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom C, Apaf1 und Caspase 9, zur Aktivierung von Caspase 9, welche DISC-unabhängig zusätzlich die Aktivierung von Caspase 8 bewirkt.

In Anwesenheit einer ausreichenden Menge des antiapoptotischen Proteins FLIP (FLICE-inhibitory protein) findet eine bevorzugte Bindung von FLIP an Caspase statt<sup>33</sup>. Der so entstandene heteromere Komplex verhindert die weitere Reifung zur aktiven Form von Caspase 8, zeigt jedoch ebenfalls eine katalytische Aktivität. Diese triggert jedoch nicht den Apoptosesignalweg, sondern führt zu einer nichtapoptotischen Signaltransduktion<sup>35</sup>. Die Aktivierung von FLIP zur Apoptoseregulation kann neben dem Fas-Signalweg auch durch weitere Todesrezeptoren sowie durch den NF- $\kappa$ B-Signalweg erfolgen.

### 1.4 Die Rolle von Fas bei entzündlichen Prozessen

Bedingt durch die ausgeprägte Expression von Fas und FasL auf T-Zellen ist dieses System auch indirekt durch Regulation der Apoptose in den T-Zellen selbst oder in Zielzellen der T-Zellen am Verlauf von verschiedenen Formen entzündlicher Prozesse beteiligt<sup>18</sup>. Zudem gibt es Hinweise, dass auch die nicht-apoptotische Fas-vermittelte Induktion von Chemokinen, z.B. IL8, zur Regulation immunologischer Prozesse beiträgt. Ein Beispiel für die immunregulatorischen Effekte des FasL-Fas-Systems sind Abstoßungsreaktionen von Allograften, bei denen der Versuch, durch die Expression von FasL auf dem Transplantat eine Abstoßung durch Apoptoseinduktion in den Organ infiltrierenden T-Zellen zu vermeiden, in manchen Fällen gelingt, aber manchmal aufgrund der Fas-induzierten Freisetzung von Chemokinen und der Rekrutierung von Neutrophilen auch eine Verstärkung der Abstoßung bewirken<sup>19,20</sup>.

### 1.5 Nicht-apoptotische Signalwege von Fas

Trotz seiner ausnehmenden Bedeutung in der Apoptoseinduktion und der Beteiligung an einer Vielzahl von proapoptotischen Prozessen erfüllt das FasL-Fas-Signalsystem wie bereits kurz erwähnt nicht-apoptotische Funktionen. So wurde z.B. eine Beteiligung des FasL-Fas-Signalsystem in der Leberregeneration und beim Neuritenwachstum gezeigt, es wurde aber auch als kostimulierender Mechanismus bei der T-Zell-Aktivierung und der Reifung von dendritischen Zellen beschrieben. Welche Signalwege Fas nutzt, um welchen nicht-apoptotische zellulären Prozesse zu stimulieren, ist noch wenig verstanden. Die wichtigsten bisher identifizierten Signalkaskaden, die durch Fas stimuliert werden, sind der NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie die Aktivierung der Kinasen JNK, p38-MAPK und ERK.

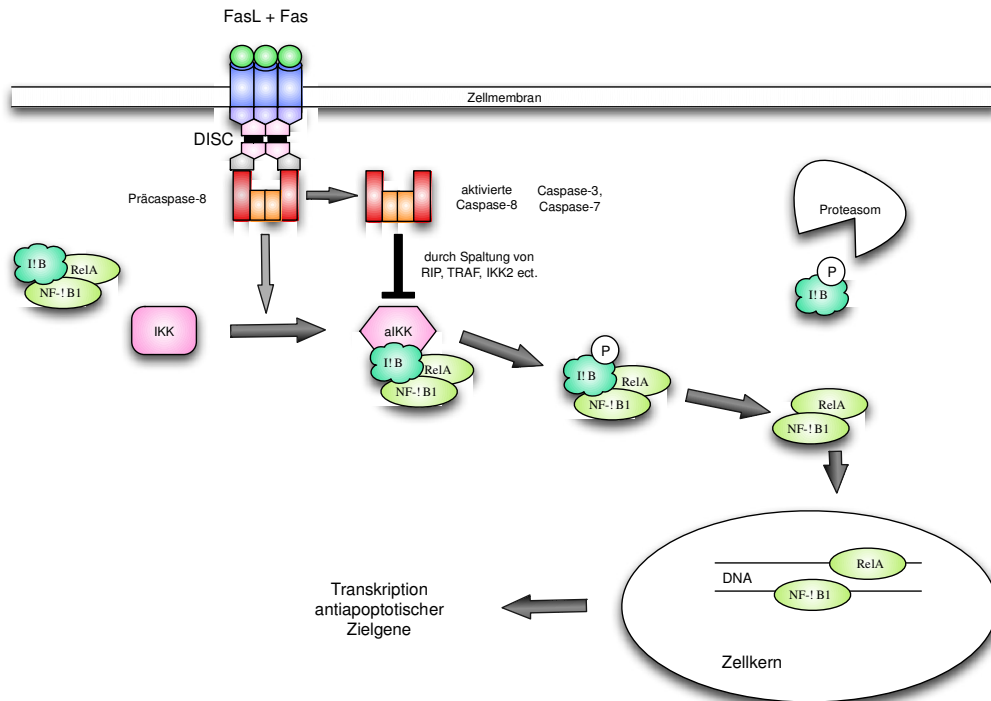
### 1.5.1 Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Fas

Die nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells NF- $\kappa$ B / Rel – Familie beschreibt eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren bestehend aus homo- und heterodimeren Proteinen, die phylogenetisch konserviert sind<sup>27,28,29</sup>. Bislang sind fünf Untereinheiten bekannt: p65/RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p50 und NF- $\kappa$ B2/p52<sup>27,28,29</sup>. Das Hauptmerkmal dieser Gruppe ist die Rel homology domain (RHD), die in Dimerisationsprozesse, Transfer zum Zellkern, DNA-Bindung und der Interaktion mit den inhibitorischen Regulatorproteinen, den I $\kappa$ B-Proteinen, beteiligt ist<sup>27,28,29</sup>.

Erstmalig wurde ein Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und dem NF- $\kappa$ B-System in RelA defizienten Mäusen festgestellt. Hier sorgte die Abwesenheit des Proteins für das Absterben der Embryonen am 15-16 Gestationstag aufgrund von durch TNF-induzierter Apoptose in Leberzellen und tödlichem Leberversagen. Im weiteren zeigte sich, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B Faktoren auch Schutz gegen ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika und p53-induzierte Apoptose bewirken. NF- $\kappa$ B-Komplexe liegen in ihrer inaktiven Form ubiquitär im Cytoplasma vor. Diese besteht aus zwei der o.g. Untereinheiten sowie dem I $\kappa$ B-Komplex, der die eigentliche Inhibierung der Untereinheiten bedingt. Zur Familie der I $\kappa$ B Proteine gehören I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  und Bcl3<sup>4</sup>. Allen gemein ist das strukturelle Hauptmerkmal dieser Familie, der *Ankyrin-Repeat*; hierbei handelt es sich um eine C-terminal gelegene Struktur in Form eines 7-fach vorliegenden helicalen Proteins<sup>27,28,29</sup>. Der *Ankyrin-Repeat* vermittelt die Bindung von I $\kappa$ B an die RHD der als Transkriptionsfaktoren wirksamen Untereinheiten<sup>49</sup>.

Bei Initialisierung des Fas-Signalweges erfolgt die Aktivierung der IKK (I $\kappa$ B-Kinasen), 900 kD Proteine, die aus den Untereinheiten IKK1 und IKK2 bestehen<sup>27,28,29</sup>. Diese phosphorylieren die I $\kappa$ B-Komplexe, wodurch es zu deren Untergang und Abbau im Proteasom kommt<sup>27,28,29</sup>. Die nun freigesetzten NF- $\kappa$ B-Untereinheiten wandern in den Zellkern und werden als Transkriptionsfaktoren tätig<sup>4</sup>.

## 1.5 Nicht-apoptotische Signalwege von Fas



**Abb. 4: Schematische Darstellung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion durch Fas.**

Durch Aktivierung von IKK durch den stimulierten Fas-Rezeptor zum hier bezeichneten aIKK erfolgt die Phosphorylierung von I $\kappa$ B sowie die Trennung von den NF- $\kappa$ B Untereinheiten. Während I $\kappa$ B ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird, wandern die Untereinheiten (hier beispielhaft RelA und NF- $\kappa$ B1) in den Zellkern; es kommt zur Transkription antiapoptotischer Zielgene. Die Aktivierung von Caspase 8 durch den DISC sowie im Folgenden auch Caspase 3 und Caspase 7 wiederum bedingt durch Spaltung von am NF- $\kappa$ B Signalweg beteiligten Proteinen eine Hemmung von aIKK<sup>2</sup>.

Der apoptoseinhibierende Effekt von NF- $\kappa$ B beruht auf einer Aktivierung von antiapoptotisch wirksamen Zielgenen wie cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis-1), cIAP2, xIAP (x-linked IAP), TRAF1 (TNF-receptor associated factor-1), FLIP, SCC-22, Bcl2-related protein A1, Bcl-xL und TRAIL-R3<sup>27,28,29</sup>. Interessanter Weise inhibiert die Apoptose reziprok auch die NF $\kappa$ B-Signaltransduktion. Dies beruht auf der Spaltung von NF $\kappa$ B-assoziierten Signalproteinen wie RIP, TRAF1, I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK2, Akt, NIK, HPK, p50 und RelA durch Caspasen<sup>27,28,29</sup>. Dies bewirkt einerseits eine Reduktion der

Menge an für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs benötigten Proteinen sowie andererseits die Entstehung von dominant-negativen wirkenden Proteinfragmenten dieser Signalmediatoren<sup>2</sup>. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über Todesrezeptoren und die Apoptoseinduktion sind also über eine negative Rückkopplung eng verknüpft. Die Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt somit zu einer Hochregulation von antiapoptotischen Signalproteinen und eine ablaufende Apoptosereaktion bedingt zusätzlich die Spaltung von am NF- $\kappa$ B-Signalweg beteiligten Proteinen<sup>2</sup>. Im Ergebnis führt dies dazu, dass einer der beiden Signalwege auf zellulärer Ebene letztendlich klar dominiert. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B findet daher oft zunächst parallel zur Apoptoseinduktion durch Fas statt, wird jedoch durch den ausgeprägten apoptotischen Effekt des Rezeptors dann meist schnell beendet<sup>2</sup>. Eine Inhibierung der Apoptose führt demnach zu einer deutlich erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung<sup>33</sup>.

### 1.5.2 Die Aktivierung des JNK-Signalwegs

#### 1.5.2.1 Bedeutung der JNK

Als Kinasen werden Proteine bezeichnet, die andere Proteine phosphorylieren. Insbesondere die Phosphorylierung von Signalmolekülen wirkt dabei oft aktivierend. MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen und die sie aktivierenden Signalkaskaden bestehen aus 3teiligen Modulen von hierarchisch aktivierten Kinasen, an deren Ende die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steht. Die jeweils endständige MAPK vor diesem Schritt benennt hierbei den Signalweg<sup>1</sup>. MAPK werden durch MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert, diese können wiederum durch MAPKK-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden<sup>2,3</sup>. In Säugetierzellen sind drei MAPK-Signalwege bekannt: i) Der JNK (cJun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase)-Signalweg; ii) Der p38-Signalweg; iii) Der ERK (extracellular-signal regulated kinase)-Signalweg<sup>1</sup>.



Alle MAPK-Signalwege können durch eine Vielzahl von Signalen aktiviert werden, z. B. durch Zytokine<sup>2,3</sup> oder exzitoxischen Stress, UV-Strahlung, den Entzug von Wachstumsfaktoren und vielem mehr<sup>4,5,6</sup>. Der JNK-Signalweg ist abhängig vom Zelltyp, dem Entwicklungsstadium und dem zellulären Mikromilieu an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen in einer Zelle beteiligt, u.a. der Differenzierung, Proliferation, Apoptoseinduktion, aber auch Schutz vor Apoptose<sup>2,3</sup>. Es existieren zehn verschiedene Isoformen der JNK, die durch Alternatives Splicing aus bislang drei bekannten Genen entstehen. Zwei dieser Gene treten ubiquitär auf, das Dritte hauptsächlich in Gehirn, Herz und den Hoden. Verantwortlich für deren Aktivierung sind insbesondere die MAPKK MKK4 und MKK7, die beide JNK an bestimmten Threonin- und Thyrosinresten phosphorylieren, wobei MKK4 tendenziell Tyrosin, MKK7 eher Threonin bevorzugt. Ebenso existiert eine Vielzahl an MAPKKK wie MEKK1-4, ASK1, TAK1 und Tpl2, die MKK4/7 und daher auch JNK aktivieren können<sup>2,3</sup>. Phosphorylierte und daher aktivierte JNK phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren ATF2, JunB, JunC, cJun und erhöhen so z.B. die Transkriptionsrate von proapoptotischen oder antiapoptotischen Genen wie beispielsweise Bax und Bcl2<sup>7,8</sup>. Das aktivierte cJun kann sich zu Homodimeren mit sich selbst oder zu Heterodimeren mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-Fos zusammenschließen, um in letzterem Fall den dimeren Transkriptionsfaktor AP1 bilden, der wiederum die Genexpression von proapoptotischen Proteinen und auch Fas selbst hochreguliert<sup>2,3,9,10</sup>.

### 1.5.2.2 Zusammenhang zwischen Fas und dem JNK-Signalweg

Dass die Fas-vermittelte Apoptose die JNK-Phosphorylierung triggern kann, hat sich bereits in mehreren Studien nachweisen lassen. Insbesondere geschieht dies durch die FADD-vermittelte Aktivierung der Caspasen Caspase 8 und Caspase 3, die durch die proteolytische Aktivierung von MEKK<sup>11</sup> indirekt stimulierend auf MKK4/7, JNK und

AP1 wirken und somit die Transkriptionrate von Fas erhöhen können<sup>12</sup>.

Zudem hat sich in manchen Beispielen gezeigt, dass durch eine Inhibierung der Fas-vermittelten Caspaseaktivierung sowohl die Apoptose als auch die JNK-Aktivierung verhindert werden kann<sup>13</sup>. Andererseits jedoch hat die Inhibierung der JNK kaum oder keinen Einfluss auf die Fas-vermittelte Apoptose<sup>13</sup>, was die Vermutung nahelegt, dass der JNK-Signalweg in diesen Beispielen downstream zur Caspasenkaskade liegt<sup>14</sup>. Obwohl die proapoptotischen Fähigkeiten der JNK keinen großen Anteil an der Fas-vermittelten Apoptose haben, kann die JNK dennoch den Ablauf der Fas-Signalwegs beeinflussen und verstärken, insbesondere durch die bereits beschriebene Hochregulation von Fas durch AP1<sup>11</sup> oder durch die Aktivierung von an der Apoptose beteiligten Proteinen wie p53 und c-myc<sup>2,3</sup>.

Alternativ gibt es auch Studien, die zeigen, dass der JNK-Signalweg auch Fas-vermittelt, aber caspasenunabhängig getriggert werden kann. Hierbei findet keine Apoptoseinduktion statt, die proapoptotischen Fähigkeiten<sup>6,14</sup> dieses Signalwegs werden eher vereinzelt auftretenden zytotoxischen Eigenschaften der JNK zugerechnet<sup>1</sup>. Dies geschieht durch die Interaktion von stimuliertem Fas mit dem rezeptorassoziiertem Protein DAXX an einer Stelle, die unabhängig von der DD liegt<sup>15</sup>. DAXX bindet in diesem Zusammenhang außerdem ASK1 (apoptosis signaling kinase 1), eine MAPKKK, die selbst zur Apoptoseinduktion befähigt ist<sup>6,14</sup>, insbesondere dann, wenn DAXX und ASK1 überexprimiert werden<sup>1</sup>. Im Anschluss bindet dieser Komplex mit dem DISC<sup>1</sup>. DAXX wirkt in Abwesenheit von ASK1 üblicherweise als Supressor der Transkription im Zellkern, wird aber durch die Bindung von ASK1 ins Zellplasma verlagert, wo es auch für Fas zugänglich ist<sup>16</sup>.

### 1.5.2.3 Zusammenhang zwischen Fas und den p38-MAPK- bzw. ERK1/2-Signalwegen

Neben dem NF- $\kappa$ B- und dem bereits erwähnten JNK-Signalweg aktiviert Fas zwei weitere nicht-apoptotische MAPK-Kaskaden, den p38-Signalweg und den ERK (p42/44)-Signalweg. Insbesondere für Letzteren zeigte sich eine Beteiligung an dem Fas-vermittelten axonalen Wachstum in dorsalen Wurzelganglien; einem der bekanntesten nicht-apoptotischen zellulären Effekte des FasL-Fas-Systems. In einer anderen Studie wurde gefunden, dass die Regeneration des N. Ischiadicus bei *lpr*-Mäusen, die durch einen zuchtbedingten Defekt im Fas-Gen einen nicht funktionsfähigen Fas-Rezeptor besitzen, caspasenabhängig verläuft, in einer weiteren Studie hingegen wurde dieser Prozess als caspasenunabhängig beschrieben<sup>17</sup>. Zudem konnte ein durch FLIP vermittelte Rekrutierung von Raf-1, einer MAP3K, an Fas gezeigt werden, sowie die anschließende ERK-Aktivierung<sup>18</sup>.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Aktivierung von Fas kann, Caspase 8-vermittelt, die Induktion des apoptotischen Zelltodes stattfinden. Dieser beruht bei Typ I Zellen auf der direkten effizienten Aktivierung von Caspase 3 durch Caspase 8, bei Typ II Zellen hingegen wird hierzu ein Verstärkermechanismus benötigt, der den intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Apoptoseweg zusätzlich stimuliert. Im Verlauf der Apoptosereaktion kommt es zur Phosphorylierung – und somit Aktivierung – von JNK, p38-MAPK und ERK, dies findet jedoch auch unabhängig vom Zelltod in apoptoteresistenten Zellen statt. Weiterhin scheint die alleinige Aktivierung von JNK, p38-MAPK und ERK keinen Einfluss auf den apoptotischen Untergang der Zelle zu haben. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass der JNK-, p38-MAPK- und ERK-Signalweg unabhängig von der Fas-induzierten Apoptoseinduktion, jedoch nach Aktivierung von Caspase 8 eigenständig wirkende Signalkaskaden bilden. Ziel der Arbeit war es deshalb zu klären, ob die Aktivierung von JNK, p38-MAPK und ERK durch Caspase 8 auch unabhängig vom apoptotischen Zelltod erfolgen kann.

## **2 Material und Methoden**

### 2.1 Reagenzien für Kultivierung, Stimulation, Lyse von Zellen

Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
FasL	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
FCS	PAA Lab-GMBH, Linz, Österreich
Glycerol	Roth, Karlsruhe
JNKII- Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
M2	Sigma, Deisenhofen
Phosphataseinhibitor I / II	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH
RPMI 1640	PAA Lab-GMBH, Linz, Österreich
SDS	Roth, Karlsruhe
TRAIL-His	R&D Systems
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA-Lösung	PAA Lab-GMBH, Linz, Österreich
TWEEN	Roth, Karlsruhe
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
Zellkulturschalen, 6cm	Greiner
Zellkulturflaschen	Greiner
96 - Napf – Platten	Greiner

## 2.2 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines Western Blots

---

Mikroskop	Olympus, Japan
Inkubator	Haerens Instruments

## 2.2 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines Western Blots

anti-JNK, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-phospho-JNK/SAPK, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-p38, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-phospho-p38-MAPK, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-ERK, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-phospho-ERK, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-Caspase 8, Maus, monoclonal	BD, Biosciences Pharmigen, Heidelberg
anti-PARP, Maus, monoclonal	BD, Biosciences Pharmigen, Heidelberg
anti-Maus HRP, Kaninchen, polyclonal	Dako Cytomation
anti-Kaninchen HRP	Cell Signaling, Beverly, MA

### 2.3 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines IL8-ELISAs

---

Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma, Deisenhofen
ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	BioTrace NT, Pall Corporation
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Entwicklermaschine	AGFA

### 2.3 Antikörper und Chemikalien zur Durchführung eines IL8-ELISAs

ABTS	Boehringer, Mannheim
anti-IL8 Antikörper	Pharmigen, San Diego
Avidin-horseradish - Peroxidase	Pharmigen, San Diego
Biotinylierter anti-Mensch IL8 Antikörper	Pharmigen, San Diego
IL8-Standards	Pharmigen, San Diego
ELISA-Reader	Anthos Lucy 2

## 2.4 Zelllinien

---

### 2.4 Zelllinien

Colo357 VK	Colo357-Zellen, mit leerem viralem Vektor transfiziert
Colo357 Bcl-xL	Colo357-Zellen, mit Bcl-xL-exprimierendem viralem Vektor transfiziert
Jurkat Rip +/+	T-Lymphozyten mit Überexprimierung von Rip
KB-Zellen	Keratinocyten, wild-type, Dr. M. Kracht, Med. Hochschule, Hannover



### 2.5 Pufferzusammensetzungen und Lösungen

Blotpuffer	100 ml Laufpufferlösung/Stock + 1,5 ml SDS (20 %ig) + 200 ml Methanol + 700 ml Wasser
Coating Buffer (ELISA)	3,6 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 8,4 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,5
10fach Laufpufferlösung (Western Blot), Stock	144 g Glycin + 30,3 g TRIS auf 1 l Wasser
Kristallviolettlösung	0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol
Laufpuffer (Western Blot)	100 ml Laufpufferlösung/Stock + 900 ml Wasser + 5 ml SDS (20 %ig)
Lysepuffer	NP 40 (1 %ig), TRIS 50 mM (pH 7,4) + NaCl 150 mM, EDTA 5 mM (pH 7,4) + Protease-Inhibitor (1 Tbl. auf 25 ml Stock)
PBS-F	1x PBS, 10 % FCS
PBS-TWEEN	1xPBS, 0,05 % Tween-20

## 2.5 Pufferzusammensetzungen und Lösungen

---

10fach PBS	26,65 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 3,12 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 81,9 g NaCl auf 1 l Wasser
Probenpuffer (Western Blot, 2-fach)	0,02 M Tris, 0,0002 M EDTA, 0,07 M SDS, 0,04 M DTT, 2,2 M Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, pH 8
Sammelgelpuffer (Western Blot)	0,5 M Tris, 0,015 M SDS; pH 6,8
TE-PBS	1x PBS, 1x Trypsin-EDTA-Lösung (10 %ig)
Trenngelpuffer (Western Blot)	1,5 M Tris, 0,015 M SDS; pH 8,8
10fach TBS	24,2 g TRIS + 80 g NaCl auf 1 l Wasser

### 2.6 Zellkultivierung

Die für die Versuche benötigten Zelllinien KB, Colo357 VK und Colo357 Bcl-xL wurden als adhärente Zellen in großen Zellkulturflaschen mit 25 ml RPMI-Medium + 10 % FCS bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Um Infektionen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurden alle Manipulationen unter keimfreier Umgebung an einer Sterilbank durchgeführt.

Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde 10 ml steriles TE-PBS verwendet. Nach ausreichender Einwirkzeit, die bei den KB-Zellen ca. 5 Minuten, bei den Colo357 Zellen ca. 45 Minuten betrug, wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium in die Flasche inaktiviert und der Rest der noch festsitzenden Zellen durch vorsichtiges Klopfen abgelöst. Nach abschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für ca. 4 Minuten und Resuspension in frischem Medium waren die Zellen gebrauchsfertig. Die nicht adhärente T-Zelllinie Jurkat Rip +/- wurde mit durchschnittlich 75 ml Medium in maximaler Dichte im Inkubator in aufrecht stehenden Flaschen kultiviert, Manipulationen am Zellbestand wurden ebenfalls an einer Sterilbank durchgeführt.

Bei einem ausreichenden Überschuss wurden die Zellen zur späteren Verwendung eingefroren, dies geschah durch Zugabe von 90 % FCS + 10 % DMSO zum zentrifugierten Zellpellet, Abfüllen in 2-ml-Kryoröhrchen und sofortigem Einfrieren bei -80° C. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen von Hand erwärmt, bis sich der Inhalt des Kryoröhrchens verflüssigte, danach sofort in ein steriles Blue Cap-Zentrifugenröhrchen übertragen, mit Medium auf 15 ml aufgefüllt, zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkultur-Flasche aufgenommen.

### 2.7 Stimulation der Zellen zur Durchführung eines Western Blots

Zur Stimulation wurden abhängig von der Größe der Zellen 1,0 - 1,5 \*10<sup>6</sup> Zellen am Tag vor der Zugabe der Reagenzien in Zellkulturschalen mit 6 cm Durchmesser und

unter Zugabe von 3 ml Medium + 10 % FCS ausgesät und über Nacht im Inkubator belassen. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen vor der Durchführung des Experiments auf eventuelle Verunreinigungen oder Bakterieninfektionen hin mikroskopisch kontrolliert und bei positivem Befund verworfen.

Im Anschluss wurden die Zellen nach Berechnung der erforderlichen Menge der gewünschten Substanzen stimuliert; diese wurden hierbei in das am Tag der Aussaat hinzugefügte Nährmedium pipettiert. Bei Verwendung des Caspaseinhibitors Benzyloxycarbonylvalyl-Alanyl-Aspartat Säure(O-Methyl)-fluoro-Methylketon (zVAD), des JNK-Inhibitors-II (JNKII) und des bei der Lösungsmittel-Kontrollgruppe verwendeten Didesoxy-Methyl-Sulfonyloxid (DMSO) wurde eine Einwirkzeit von einer halben Stunde kalkuliert, bevor die eigentliche Zugabe des mit dem Antikörper M2 über 30 Minuten vorvernetzten FasL erfolgte; dies stellte gleichzeitig den Beginn der Stimulationsdauer von üblicherweise 4 Stunden dar. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen bis zu ihrer Ernte im Inkubator belassen.

## 2.8 Zellernte und Herstellung von Zelllysaten

Nach Ablauf der Stimulationszeit erfolgte zunächst eine erneute mikroskopische Kontrolle auf Infektionen. Bei erhaltener Sterilität wurde ein Zelllysat hergestellt. Dazu wurden die Zellkulturschalen sofort nach Herausnahme aus dem Inkubator zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelegt. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte durch vorsichtiges Abziehen des Bodens der Kulturschale mit einem Zellschaber, anschließend wurde unter Zugabe von eiskaltem PBS das Medium mit den gelösten Zellen in kalte Zentrifugenröhrchen übertragen und bei 1200 rpm in der auf 4° C vorgekühlten Zentrifuge für 4 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet sofort mit 120 µl 4fachem Ladepuffer auf Eis resuspendiert, sonifiziert und bei 96° C auf dem Heizblock für ca. 2 min aufgeköcht. Zur Lagerung wurden die Lysate im Gefrierschrank bei -20° C aufbewahrt.

### 2.9 Western Blotting

Zum Nachweis der Proteine JNK, p38, ERK, deren phosphorylierte Formen sowie Caspase 8 und PARP wurde die Methode des Western Blots verwendet, bei der sich Proteine abhängig von ihrer Größe und der Ladung in einem elektrischen Feld auftrennen, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Hilfe einer Antikörperfärbung auf Röntgenfolie dargestellt werden. Das zur Auftrennung der Proteine benötigte 10 %ige Polyacrylamid-Trenngel wurde nach Vermischung der Komponenten in Form gegossen, zur Aushärtung mit Isopropanol überschichtet und nach erfolgter Polymerisation mit Sammelgel überzogen. Zur Formung von Taschen für das Einfüllen der Proben wurde vorübergehend ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt. Die Proben wurden bei 95° C erhitzt, kurz abgekühlt und in die Taschen des polymerisierten Sammelgels eingefüllt. Die Kammer der Gelelektrophorese wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und eine Spannung von 90 mV an das Sammelgel, 120 mV an das Trenngel angelegt.

Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden Whatman-Papier und Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit 100 % Methanol befeuchtet. Die Blotkammer wurde in der Reihenfolge Anode, 2 Blatt Whatman-Papier, Membran, Gel, 2 Blatt Whatman-Papier, Kathode beladen; das Blotting erfolgte bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro 1 cm<sup>2</sup> Membranfläche für 90 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch in TBS-TWEEN gelegt. Nach dem Blotting wurde der Erstantikörper in der Konzentration von 0,01 % in TBS-TWEEN auf die Membran gebracht und bei 4° C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte 3maliges Waschen mit TBS-TWEEN über 1 Stunde und eine erneute Inkubation mit dem Zweitantikörper (0,01 % in TBS-TWEEN) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach weiterem, 3maligem Waschen über 1 Stunde erfolgte die Beschichtung der Membran mit Substrat zur Belichtung eines Röntgenfilms, bedingt durch eine Lichtemission der konjugierten Antikörper-

Peroxidase-Komplexe bei der Umsetzung des Substrats ECL. Die gefärbte Nitrozellulose - Membran wurde mit Entwicklerflüssigkeit, die in den Teilen 1:1 gemischt wurde, bedeckt; diese wurden für 1 Minute auf der Membran belassen, anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgezogen und in einer Entwicklungskassette ein Röntgenfilm etwa 3-15 Minuten belichtet. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte maschinell in der Dunkelkammer.

## 2.10 Bestimmung der Zellsterblichkeit im Kristallviolett (KV)-Zytotoxizitätstest

Der KV-Zytotoxizitätstest wurde zur quantitativen Ermittlung von toten Zellen bei der Stimulation mit FasL/M2 verwendet. Dazu wurden am Vortag auf eine 96-Napf-Platte  $1,5 \cdot 10^4$  adhärenente Zellen in 200  $\mu$ l Medium + 10 % FCS pro Napf ausgesät und über Nacht im Inkubator belassen. Am Tag der Durchführung wurden die Platten unter dem Mikroskop auf Bakterieninfektionen hin kontrolliert und bei nicht erhaltener Sterilität verworfen. Zur Stimulation wurde das Nährmedium vom Vortag durch frisches Medium mit den darin in der gewünschten Konzentration gelösten Reagenzien ersetzt und für 6 Stunden im Inkubator inkubiert. Bei Vorstimulation mit Cycloheximid (CHX) wurde eine Einwirkzeit von 1 Stunde, bei zVAD und JNKII eine Einwirkzeit von 30 Minuten eingehalten. Um durch das Pipettieren bedingte Artefakte im Ergebnis zu minimieren, wurden jeweils 3 aufeinander folgende Nüpfel identisch stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium vorsichtig entfernt und die noch adhärenente Zellen mit KV-Lösung angefärbt, nach 15 Minuten mit PBS-TWEEN gewaschen, getrocknet und im ELISA – Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

## 2.11 Messung der IL8-Produktion mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung des Zytokins Interleukin 8, das u. a. bei verstärkter Zellproliferation und insbesondere nach Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs oder der MAP-Kinasen gebildet wird, erfolgte im Verfahren des enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA.

Dafür wurden die benötigte Anzahl von 96-Napf-ELISA-Platten am Vortag je 50  $\mu$ l pro Napf Coating-Buffer im Verhältnis 1:250 mit Anti-IL8-Antikörper gefüllt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Dies führt zur Bindung des AKs an die Plastikoberfläche. Die Aussaat und Stimulation der Zellen erfolgte parallel analog zum KV-Zytotoxizitätsassay, nach Ablauf der Stimulationszeit von 8 Stunden wurde der Überstand jedes einzelnen Napfes zur Durchführung des ELISAs abpipettiert; die Zellen wurden verworfen. Nach 3maligem Waschen mit PBS-TWEEN (je 200  $\mu$ l/ Napf) wurden die ELISA-Platten mit dem immobilisierten anti-IL8 AK für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 200  $\mu$ l PBS mit 10 % FCS je Napf geblockt. Im Anschluss erfolgte 3maliges Waschen mit PBS-TWEEN und das Auftragen der Zellkulturüberstände (je 100 $\mu$ l/ Napf) und Standards; die Inkubationszeit hierbei betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Platten wurden erneut fünfmal gewaschen wie beschrieben und nach Auftragen des Working Detectors (biotinylierter anti-Mensch IL8-Antikörper und Avidin-Meerrettich-Peroxidase, beide gemischt mit PBS + 10 % FCS im Verhältnis 1:250) bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert, danach erneut siebenmal mit PBS-TWEEN gewaschen und mit 100  $\mu$ l/ Napf Substrat-Reagenz (1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer) versetzt. Nach kurzer Wartezeit erfolgte die Messung der Proben im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

### **3 Ergebnisse**

#### 3.1 Analyse der FasL-induzierten JNK-Aktivierung in Jurkatzellen

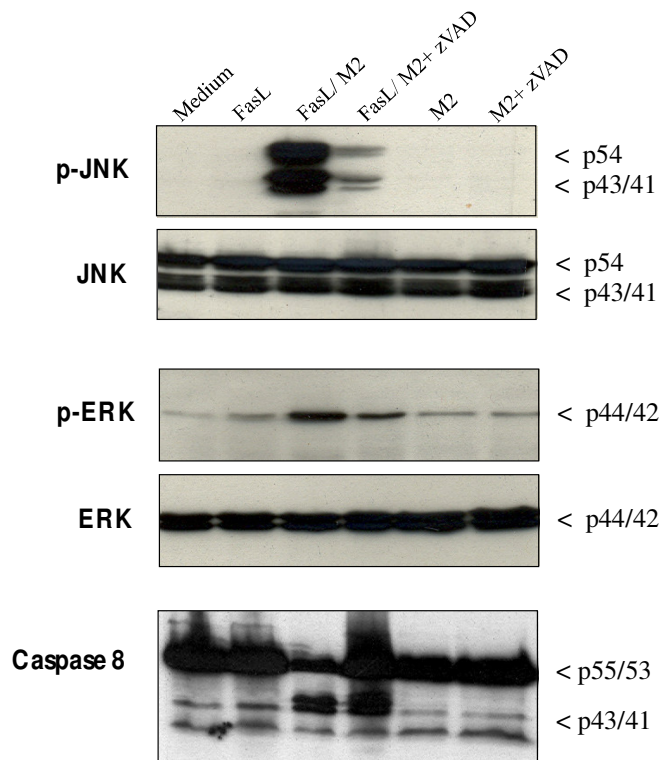
Jurkat Rip +/- Zellen sind eine T-Zell-Linie, die als solche naturgemäß über eine signifikante Anzahl Fas (Apo1/CD95)-Rezeptoren verfügt und sehr sensitiv auf Fas-Stimulation mit Apoptose reagieren. An ihnen sollte geprüft werden, ob es nach Aktivierung von Fas möglich ist, eine Aktivierung der JNK nachzuweisen. Hierzu wurde der Fas-Rezeptor mit einer rekombinanten löslichen Form seines Liganden FasL stimuliert, der zuvor mit Hilfe eines Flag-spezifischen Antikörpers, der ein Flag-Epitop, das im rekombinanten Liganden enthalten ist, erkennt, oligomerisiert wurde, um so dessen Aktivität zu erhöhen. Dann wurde die JNK-Aktivierung dadurch erfasst, dass die phosphorylierte aktive Form des Moleküls mittels phospho-JNK-spezifischen Antikörpern mittels Western Blotting nachgewiesen wurde. Um zunächst zur Kontrolle die erwartete Aktivierung des Fas-Moleküls zu zeigen, wurde die Prozessierung des Caspase 8 Moleküls mittels Western Blotting analysiert. Letzteres zeigte, dass in Jurkat-Zellen, die mit oligomerisiertem FasL stimuliert wurden, nicht aber in unbehandelten Kontrollzellen oder Jurkat-Zellen, die mit dem Caspase-8-Inhibitor Benzyloxycarbonylvalyl-Alanyl-Aspartatensäure (O-Methyl)-fluoro-Methylketon (zVAD) behandelt wurden, ein p18-Spaltprodukt der Caspase 8 auftaucht, das typisch für die aktive prozessierte Form des Enzyms ist (Abb. 5). Dies zeigte, dass in den mit oligomerisiertem FasL behandelten Jurkat-Zellen wie erwartet eine starke Aktivierung von Fas eingetreten war. Mit den phospho-JNK-spezifischen Antikörpern zeigte sich in den mit oligomerisierten FasL behandelten Zellen gleichfalls ein stark erhöhtes Western Blot-Signal. Offensichtlich führt also die Aktivierung von Fas in Jurkat-Zellen auch zu einer starken Aktivierung des JNK-Signalwegs (Abb. 5). Interessanterweise kam es bei Zugabe des Caspase-Inhibitors zVAD in einer Konzentration von 20  $\mu$ M ebenfalls zu einer deutlichen aber nicht vollständigen Inhibition der FasL-induzierten Aktivierung der JNK. Oligomerisierter FasL stimuliert auch die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2



### 3.1 Analyse der FasL-induzierten JNK-Aktivierung in Jurkatzellen

---

wie mit Hilfe phospho-ERK-spezifischen Antikörper nachweisbar war. Dieses FasL-induzierte Ereignis wurde durch zVAD nur wenig inhibiert (Abb. 5).



**Abb. 5: Stimulation mit FasL/ M2 führt in Jurkat Zellen zur Aktivierung von JNK, ERK und Caspase 8.**

Jurkat-Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen an FasL (200 ng/ml), anti-Flag M2 (500 ng/ml) und zVAD (20  $\mu$ M) für 3 Stunden inkubiert und anschließend Totalzelllysate mittels Western Blotting bezüglich der Präsenz der angegebenen Proteine hin analysiert. In den Gruppen mit zVAD wurde dieser Inhibitor gegebenenfalls 30 Minuten vor dem FasL hinzugegeben. Die Inkubationszeit zur Vernetzung von FasL und M2 betrug 30 Minuten.

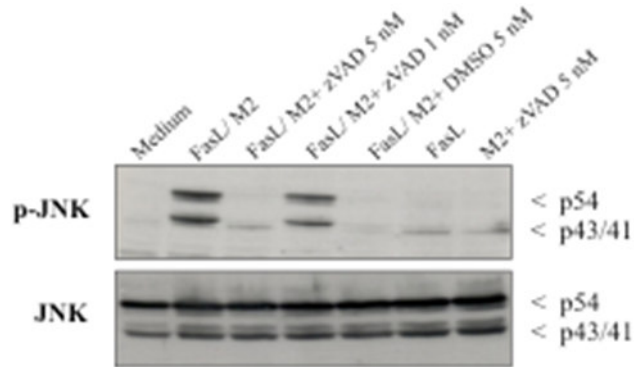
Angesichts der gleichzeitigen Caspase 8-Aktivierung, JNK-Aktivierung und Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen stellte sich nun die Frage, ob die FasL-induzierte JNK-Aktivierung etwa nur als Epiphänomen des programmierten Zelltods zu sehen ist, oder doch einen zwar mit der Apoptose eng verbundenen, aber doch eigenständigen Signalweg darstellt

### 3.2 Die FasL-induzierte JNK-Phosphorylierung in KB-Zellen korreliert mit der Apoptoseaktivität

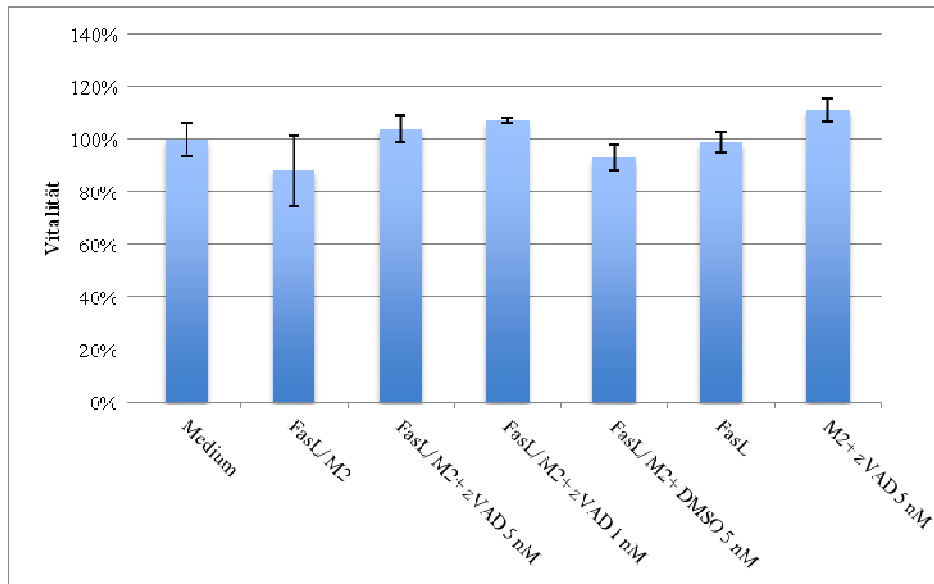
Im nächsten Schritt wurden die Effekte einer Stimulation mit FasL auf KB-Zellen, einer Keratinozytenzelllinie, die im Vergleich zu Jurkat-Zellen eine geringere Apoptosesensitivität aufweisen, analog zu dem vorhergehenden Experiment mit Jurkat-Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass es bei einer Stimulation der Zellen über 4 Stunden mit oligomerisiertem FasL zur JNK-Aktivierung kommt. Die Zugabe von zVAD mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die JNK-Aktivierung, konnte aber die moderat stattfindende Apoptoseinduktion blockieren (Abb. 6a,b). Bei einer zVAD-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurde jedoch auch die FasL-induzierte JNK-Aktivierung inhibiert. Es wurde auch der Einfluss des Lösungsmittels für zVAD, Dimethylsulfoxid (DMSO), auf die JNK-Aktivierung und die Apoptoseinduktion durch FasL mit der maximalen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  kontrolliert. Erwartungsgemäß hatte DMSO keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von JNK.

### 3.2 FasL-induzierte JNK-Phosphorylierung in KB-Zellen korreliert mit der Apoptoseaktivität

a)



b)



**Abb. 6a+b:** In KB-Zellen kommt es auch unter Apoptoseschutz durch zVAD zur Aktivierung von JNK. KB-Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen an FasL (200 ng/ml), anti-Flag M2 (500 ng/ml) und zVAD (1 und 5  $\mu$ M) oder DMSO (5 nM) für 4 Stunden inkubiert und anschließend Totalzelllysate mittels Western Blotting bezüglich der Präsenz der angegebenen Proteine hin analysiert oder die Zellvitalität mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Präzipitationszeit für FasL und anti-Flag M2 betrug 30 Minuten. In den Gruppen mit zVAD wurde dieser Inhibitor gegebenenfalls 30 Minuten vor der Stimulation mit FasL/ M2 hinzugegeben. Für den KV-Zytotoxizitätstest wurden 20.000 Zellen/ Napf in 100  $\mu$ l Nährmedium kultiviert, die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

Somit stellte sich die Frage, ob es angesichts dieses Ergebnisses möglich wäre, JNK-Aktivierung völlig unabhängig vom Zelltod nachweisen zu können.

### 3.3 FasL-induziert JNK-Aktivierung apoptoseunabhängig in Colo357 Bcl-xL Zellen

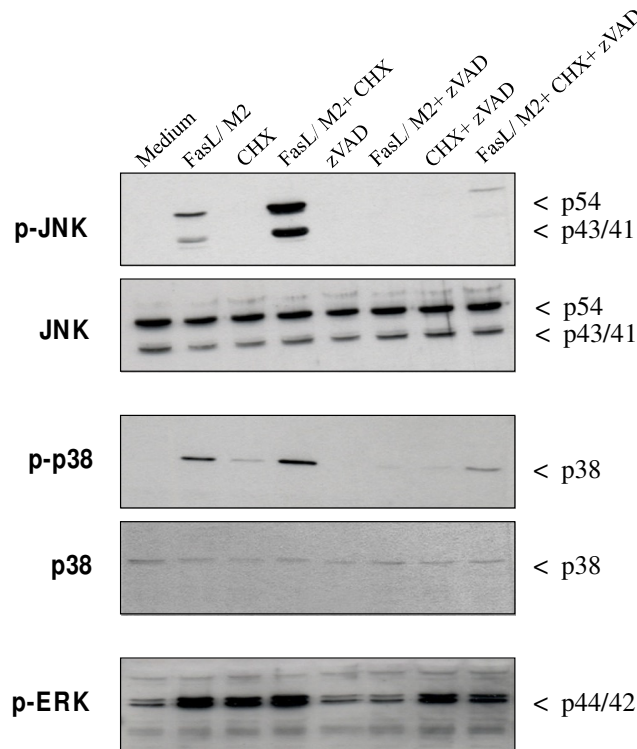
Die folgende Versuchsreihe wurde an der Colon-Karzinomlinien-Transfektante Colo357 Bcl-xL durchgeführt, die das antiapoptotischen Bcl-xL-Protein exprimiert und dadurch apoptoseresistent ist. Erneut wurde eine Stimulation mit oligomerisiertem FasL und zVAD entsprechend den vorhergehenden Versuchen über 4 h durchgeführt und die so behandelten Zellen auf eine mögliche Phosphorylierung der JNK hin untersucht. Dabei zeigte sich eine ausgeprägte JNK-Aktivierung bei Zugabe des vorvernetzten FasL, die sich durch eine vorangegangenen Stimulation der Zellen mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) weiter verstärken ließ (Abb. 7a). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich auch bei der Analyse der JNK-verwandten p38-Kinase (Abb. 7a). Auf die FasL-induzierte ERK-Aktivierung hatte CHX im Wesentlichen keinen Einfluss (Abb. 7a). Die Gabe von CHX bewirkt in dieser Konzentration eine Hemmung der Proteinbiosynthese, ohne die Zelle direkt zu schädigen, was im Regelfall zu einer Steigerung der apoptotischen Wirkung des oligomerisierten FasL führt. In diesem Falle kam es jedoch aufgrund der Bcl-xL-Expression zu einem weitgehenden Überleben der Zellen (Abb. 7b). Obgleich in den Bcl-xL Zellen praktisch kein Zelltod induziert wurde, konnte die Aktivierung von JNK und p38 durch Zugabe von zVAD gehemmt werden (Abb. 7a).

Zeitgleich wurde ebenfalls ein KV-Zytotoxizitätsassay analog zu den Gruppen des JNK-Stimulationsversuchs durchgeführt, wobei sich die Apoptoseresistenz der verwendeten Zelllinie auch unter dem Einfluss von CHX plus oligomerisiertem FasL bestätigte (Abb. 7b). Lediglich bei Stimulation mit dem vorvernetzten FasL zeigte sich eine geringe Verminderung der Zellzahl.

Dieses Phänomen konnte bei mikroskopischer Betrachtung der Zellen jedoch nicht auf ein vermehrtes Sterben zurückgeführt werden und erklärt sich am ehesten durch eine

technisch bedingte, von Beginn des Versuchs an bestehende, herabgesetzte Anzahl von Zellen oder eventuell der Induktion von Zytostase.

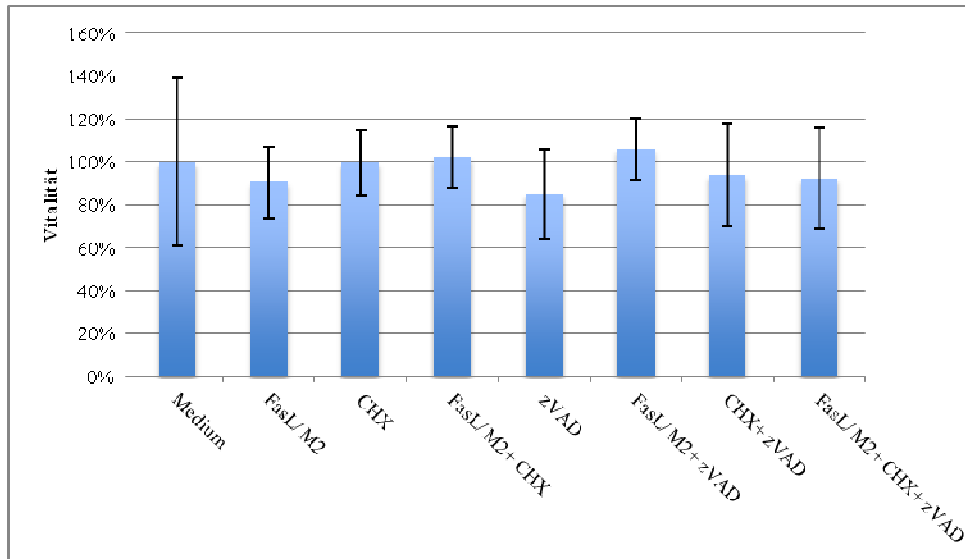
a)



**Abb. 7a:** In apoptoresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen lässt sich unabhängig vom Zelltod die Aktivierung von JNK, p38 und ERK nachweisen.

Colo357 Bcl-xL Zellen wurden mit FasL (200 ng/ml), anti-Flag M2 (500 ng/ml), zVAD (2  $\mu$ M) und CHX (2,5  $\mu$ g/ml) über 4 Stunden inkubiert und Totalzelllysate zur Untersuchung der angegebenen Proteine hergestellt. Die Vorbehandlung mit zVAD erfolgte 30 Minuten, mit CHX 1 Stunde vor Stimulation mit FasL/M2. FasL und anti-Flag M2 wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten vorvernetzt.

b)



**Abb. 7b:** In apoptoresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen lässt sich unabhängig vom Zelltod die Aktivierung von JNK, p38 und ERK nachweisen.

Colo357 Bcl-xL Zellen wurden mit FasL (200 ng/ml), anti-Flag M2 (500 ng/ml), zVAD (2  $\mu$ M) und CHX (2,5  $\mu$ g/ml) über 4 Stunden zur Herstellung von Totalzelllysaten und Bestimmung der Zellvitalität im KV-Zytotoxizitätssassay stimuliert. Die Zugabe von zVAD erfolgte 30 Minuten vor der Stimulation mit FasL/ M2, für CHX wurde 1 Stunde kalkuliert. Für den KV-Zytotoxizitätssassay wurden je 15.000 Zellen/ Napf in 200  $\mu$ l Nährmedium kultiviert.

Die hier vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die FasL-induzierte JNK-Aktivierung in Colo357 Zellen ein durch Caspasen vermittelter, aber Zelltod-unabhängiger Prozess ist. Im Anschluss an dieses Experiment wurde nun die Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase 8 und Effektorcaspasen analysiert. Hierzu wurde die Prozessierung von Caspase 8 und des Effektorcaspasensubstrats PARP untersucht.

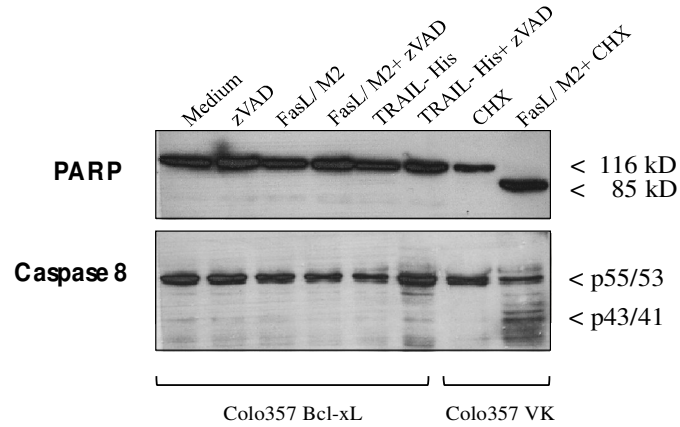
### 3.4 Darstellung der Prozessierung von Caspase 8 und PARP in Colo357-Zellen

Das Chromatin-assoziierte Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein in Eukaryonten ubiquitär vorliegendes Protein, das den Transfer von ADP-Ribose auf eine Vielzahl von Kernproteinen vermittelt. Insbesondere ist PARP ein prototypisches Substrat, das während der Apoptose durch Effektorcaspasen gespalten wird. Die Detektion der PARP-Prozessierung mittels Western Blotting dient daher oft zum Nachweis von Apoptose.

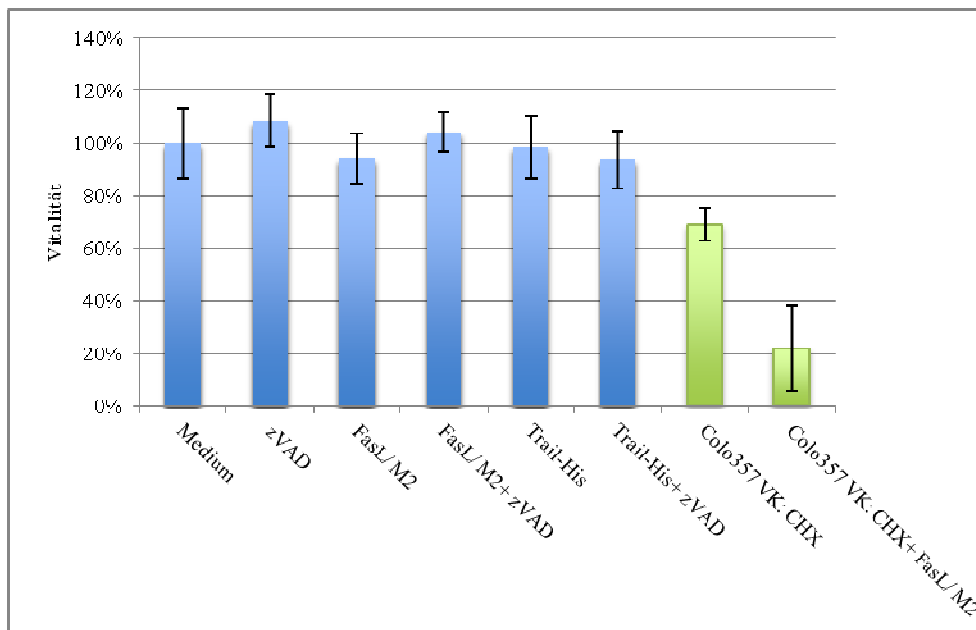
Im Folgenden wurden sowohl Colo357 Bcl-xL Zellen als auch die dazu korrespondierenden, mit einem Leervektor transfizierten Kontrollzellen, Colo357 VK verwendet. Letztere sind dabei, im Gegensatz zu den Bcl-xL-Transfektanten, apoptosesensitiv. Die Zellen wurden wie auch in den vorausgegangenen Experimenten mit oligomerisierten FasL stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), der ähnlich apoptotisch wirkt wie der FasL, stimuliert. In diesen Experimenten wurde deutlich, dass es in den apoptoseresistenten Colo357 Bcl-xL nicht zu einer Prozessierung von PARP kommt (Abb. 8a). Procaspase 8 wurde hingegen sowohl in den apoptoseresistenten Bcl-xL-Transfektanten als auch in den apoptosesensitiven Zellen prozessiert, was aus einer Abnahme der Menge der Proform des Moleküls im Western Blot ersichtlich war (Abb. 8a). Zum direkten Vergleich erfolgte die zeitgleiche Stimulation von Colo357 VK Zellen, wobei es erwartungsgemäß nach vorheriger Sensibilisierung der Zellen mit CHX und Stimulation des Fas-Signalweges zur Aktivierung von Caspase 8 wie auch zur Prozessierung von PARP kam (Abb. 8a). In parallel durchgeführten Zytotoxizitätstests bestätigte sich die bekannte Apoptoseunempfindlichkeit der Colo357 Bcl-xL Zellen sowohl bei Stimulation des TRAIL- wie auch des Fas-Signalweges in den o.g. Konzentrationen, während die mit Leervektor transfizierten Zellen eine deutliche Sensitivität für Apoptose bei der Stimulation mit dem vorvernetzten FasL zeigten (Abb. 8b).

### 3.4 Darstellung der Prozessierung von Caspase 8 und PARP in Colo357-Zellen

a)



b)



**Abb. 8a+b:** Durch Stimulation mit FasL/ M2 und TRAIL kommt es in apoptoseresistenten Colo357Bcl-xL Zellen nicht zu einer Aktivierung von PARP, jedoch zu einer Prozessierung von Caspase 8.

Colo357 Bcl-xL Zellen sowie die Vektorkontrollform Colo357 VK Zellen wurden in den angegebenen Kombinationen mit FasL (200 ng/ml), anti-Flag M2 (500 ng/ml), zVAD (2  $\mu$ M), CHX (2,5  $\mu$ g/ml) und TRAIL-His (50 ng/ml) über 4 Stunden zur Durchführung des Western Blots bzw. über 24 Stunden zur Analyse der Zellvitalität mittels KV-Zytotoxizitätsassay stimuliert. Gegebenenfalls erfolgte die Vorinkubation mit zVAD über 30 Minuten, mit CHX über 60 Minuten. Die Präzipitationszeit für FasL und anti-Flag M2 betrug ebenfalls 30 Minuten. Für den KV-Zytotoxizitätsassay wurden 20.000 Zellen/ Napf in 200  $\mu$ l Nährmedium kultiviert.

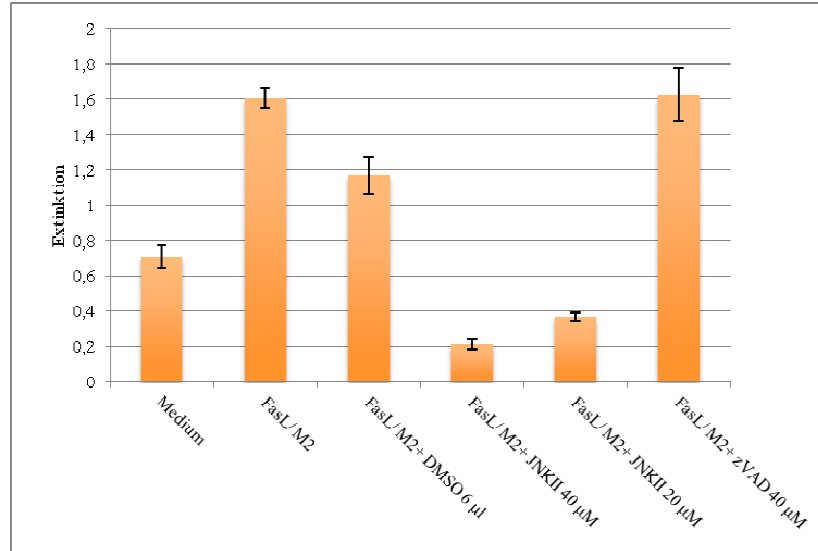


### 3.5 Nachweis des Zusammenhangs zwischen der JNK-Aktivierung und der Produktion von Interleukin 8 bei Colo357 Bcl-xL Zellen

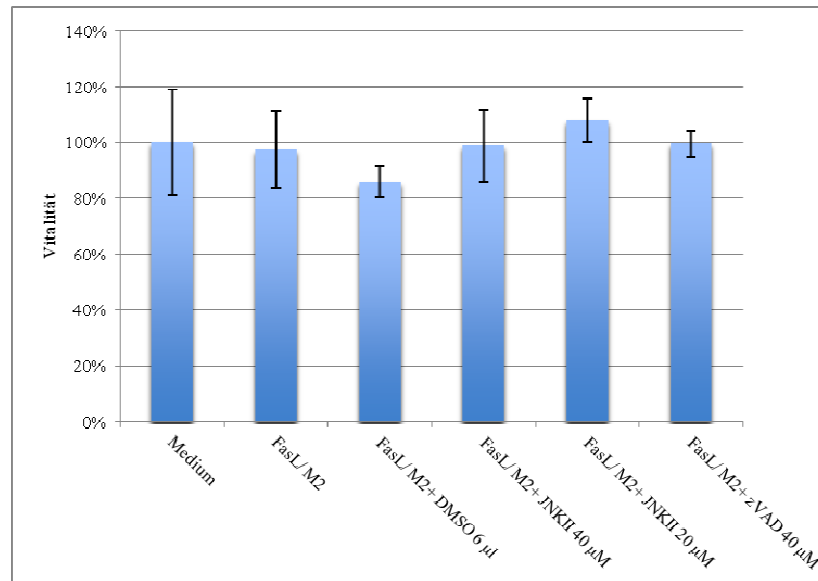
Die Synthese von Interleukin 8 (IL8) spielt im Rahmen entzündlicher Prozesse eine wesentliche Rolle. Voruntersuchungen zu diesem Thema zeigten bereits die Induktion von IL8 durch den Fas-Signalweg und das NF- $\kappa$ B System. An IL8-produzierenden Zellen sollte nun eine Beteiligung des JNK-Signalwegs an der FasL-induzierten IL8-Produktion untersucht werden. Ähnlich wie in den vorhergehenden Versuchen wurden Colo357 Bcl-xL Zellen mit oligomerisiertem FasL und zVAD behandelt sowie zusätzlich auch mit dem selektiven JNK-Inhibitor JNKII inkubiert. Die Produktion von IL8 wurde mittels des IL8-ELISA-Protokolls bestimmt. Auffallend war eine quantitativ nahezu gleiche, deutlich gesteigerte Produktion von IL8 bei Stimulation mit dem FasL alleine bzw. mit Zugabe von zVAD (Abb. 9a). Stimulation in der Anwesenheit des Inhibitors JNKII resultierte in einer deutlich reduzierten Produktion von IL8, die selbst unterhalb der nicht stimulierten Mediumkontrollgruppe lag (Abb. 9a). Mit zunehmender Verdünnung des JNK-Inhibitors nahm dieser Effekt ab und es kam zu einer langsam ansteigenden IL8-Produktion (Abb. 9a). Im simultan durchgeführten KV-Zytotoxizitätstest bestätigte sich die Apoptoseresistenz der verwendeten Zelllinie (Abb. 9b).

3.5 Nachweis des Zusammenhangs zwischen der JNK-Aktivierung und der Produktion von Interleukin 8 bei Colo357 Bcl-xL Zellen

a)



b)



**Abb. 9a+b:** Die Hemmung der JNK-Aktivierung durch JNKII in Colo357 Bcl-xL Zellen führt zu einer Verminderung der IL8-Produktion, während die alleinige Stimulation mit FasL/ M2 die IL8-Produktion deutlich anhebt.

Nach Stimulation der Colo357 Bcl-xL Zellen für 6 Stunden mit dem 30minütig vorvernetzten FasL (200 ng/ml) und anti-Flag M2 (500 ng/ml) wurde gemäß ELISA-Protokoll die relative IL8-Produktion durch Messung der Extinktion bestimmt (Abb. 9a) sowie nach einer Inkubationszeit von ebenfalls 6 Stunden durch Herstellung von Totalzelllysaten mittels Kristallviolett-Färbung die Zellvitalität gemessen (Abb. 9b). Die Vorbehandlung mit JNK II (40 bzw. 20 µM) sowie zVAD (40 µM) und DMSO (6 µl) erfolgte 30 Minuten vor der FasL/ M2-Stimulation.

4.1 Die JNK-Aktivierung erfolgt durch Fas und lässt sich durch Inhibierung von Caspase 8 partiell unterdrücken

---

## **4 Diskussion**

4.1 Die JNK-Aktivierung erfolgt durch Fas und lässt sich durch Inhibierung von Caspase 8 partiell unterdrücken

Bereits in früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Fas in T-Zellen in einer Aktivierung der JNK resultiert<sup>50,51</sup>. So zeigte sich auch in dieser Arbeit (siehe 3.1), dass in der apoptosesensitiven T-Zelllinie Jurkat vernetzter, d.h. hochaktiver FasL die Phosphorylierung, d.h. die Aktivierung der JNK induziert. Die Zellen starben im genannten Fall erwartungsgemäß nach Stimulation mit FasL, dies spiegelte sich auch in der Prozessierung der Caspase 8 wieder. Dieses wurde bereits auch in der Literatur beschrieben<sup>50,51</sup>. Da unter apoptotischen Bedingungen Effektorcaspasen zur Spaltung und Aktivierung verschiedener JNK-stimulierender Proteine führen, ist es nicht verwunderlich, dass es zu einer solchen Apoptose-assoziierten JNK-Aktivierung kommt. Nach Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD vor der Stimulation mit FasL wurde nun interessanterweise die Phosphorylierung von JNK nicht gänzlich unterdrückt, sondern lediglich reduziert. Diese zeigte sich an einer quantitativ abgeschwächten, jedoch noch deutlich nachweisbaren Detektierbarkeit dieser modifizierten JNK-Form im Western Blot (Abb. 5). Bei der Darstellung der Caspase 8 hat sich zwar eine beginnende Prozessierung in Anwesenheit von zVAD zum p43/45-Intermediat gezeigt, jedoch keine vollständige Prozessierung zu den voll aktivierten Spaltprodukten p12 und p18. Die Zellen waren daher gegen das Absterben durch Apoptose geschützt. Dasselbe Ergebnis wie für JNK zeigte sich auch für die JNK-verwandte Kinase p44/42. Auch hier erfolgte eine ausgeprägte Aktivierung der Kinasen durch Stimulation mit FasL, weiterhin zeigte sich eine ebenfalls reduzierte, jedoch deutlich vorhandene Restmenge der aktiven Phospho-p44/42-Form bei vorheriger Gabe von zVAD (siehe Abb. 5).

Aus den genannten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Aktivität der Caspase 8 erwartungsgemäß<sup>11,12</sup> Einfluss auf die JNK- und p42/44-Aktivierung nimmt, jedoch nicht absolut essentiell in diesem Zusammenhang ist. Die Fas-vermittelte Aktivierung

von JNK und p44/42 erfolgte daher in dieser Arbeit durch Caspase 8-abhängige und unabhängige Mechanismen.

#### 4.2 Die JNK-Aktivierung durch FasL kann unabhängig vom Zelltod erfolgen

In Anlehnung an den Nachweis einer von Caspaseaktivität zumindest teilweise abhängigen JNK-Aktivierung durch Fas sollte nachfolgend festgestellt werden, ob dieses Phänomen nur koinzidentuell bei der verwendeten Zelllinie auftritt oder durch einen eigenständigen Signalweg an die Caspaseaktivierung auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen gekoppelt ist. Durch Verwendung der von Natur aus wenig apoptosesensitiven Keratinozytenzelllinie KB in 3.2 sowie der durch die stabile Transfektion mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-xL apoptoseresistent gewordenen Colon-Karzinomzelllinie Colo357 Bcl-xL konnte mit der simultanen Durchführung eines Zytotoxizitätsassays gezeigt werden, dass die caspaseabhängige JNK-Aktivierung unabhängig vom Zelltod stattfinden kann und somit kein Epiphänomen der Apoptose darstellen muss (Abb. 6b und 7b).

So wurde bei der FasL-Stimulation der KB-Zellen zeitgleich der Caspase-Inhibitor zVAD zugegeben, um die Bedeutung der Caspaseaktivierung auf die JNK-Aktivierung zu untersuchen. Tatsächlich zeigte sich, wie bereits in der Literatur vorbeschrieben<sup>13</sup>, bei einer zVAD-Konzentration von 5  $\mu$ M eine Blockierung sowohl der JNK-Phosphorylierung als auch der schwachen aber signifikanten Apoptose. Bei der deutlich reduzierten Konzentration von 1  $\mu$ M jedoch fand eine -wenn auch etwas reduzierte- Aktivierung der JNK statt, während die Apoptose noch immer gehemmt war. Da die reduzierte Konzentration von zVAD eine JNK-Phosphorylierung zuließ, die Apoptose aber inhibierte, liegt die Vermutung nahe, dass die caspaseabhängige JNK-Aktivierung in diesem Zellmodell nicht vollständig apoptoseabhängig stattfindet, sondern ein weiterer, möglicherweise parallel zur apoptotischen Caspaseaktivierung liegender Signalweg existiert, der gleichfalls Caspasen benötigt. Bei den Stimulationsexperimenten mit den apoptoseresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen erfolgte neben der Analyse der JNK-Aktivierung auch eine Untersuchung der Aktivierung von

p38 und p44/42, zudem wurde eine Vorbehandlung der Zellen mit CHX durchgeführt, das typischerweise durch Hemmung der Proteinbiosynthese kurzlebiger Survivalfaktoren eine Verstärkung der Caspase 8-Aktivierung durch Todesrezeptoren bewirkt<sup>52</sup>. In den mit CHX vorbehandelten Colo357 Bcl-xL Zellen gibt es daher eine stärkere FasL-induzierte Caspase 8-Aktivierung, die allerdings aufgrund der Expression des anti-apoptischen Bcl-xL-Proteins nicht zur Apoptose führt (Abb. 7a). Nach CHX-Zugabe zeigte sich eine deutlich verstärkte Aktivierung der JNK sowie der p44/42-Kinase, nicht jedoch der p38-Kinase, wodurch sich der Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Caspase 8-Aktivität und der JNK-Aktivierung sowie der Aktivierung des p44/42-Signalweges ergab. Im Gegensatz zu den Jurkat- und KB-Zellen fand jedoch keine Phosphorylierung von JNK, p44/42 oder p38 bei Gabe des Caspaseinhibitors zVAD statt. Dies zeigt eindeutig, dass in diesen Zellen ein Caspase-abhängiger, aber Apoptose-unabhängiger Signalweg zur Aktivierung der JNK führt.

#### 4.3 Die IL8-Produktion erfolgt mutmaßlich unabhängig von der JNK-Aktivität

Im Folgenden sollte der Einfluss der aktivierten JNK auf die Interleukin 8-Produktion in Fas-stimulierten Zellen an Beispiel der Colo357 Bcl-xL Zelllinie untersucht werden. Wie in 3.5 gezeigt, führt die Stimulation der Colo357 Bcl-xL Zellen mit dem vorvernetzten FasL zu einem deutlichen Anstieg der Interleukin 8-Produktion. Unter Zugabe des Caspase-Inhibitors zVAD kommt es in den FasL-stimulierten Zellen zur unveränderten Produktion von Interleukin 8, woraus sich schließen lässt, dass die FasL-induzierte Interleukin 8-Produktion unabhängig von der JNK-Aktivität stattfindet, die unter diesen Bedingungen ja inhibiert wird. Bei Zugabe des JNK-spezifischen Inhibitors JNKII wird jedoch die Produktion von Interleukin 8 deutlich supprimiert. Dieses Ergebnis steht jedoch in eklatantem Widerspruch zu der vorab postulierten, JNK-unabhängigen Interleukin 8-Produktion in FasL-stimulierten Colo357 Bcl-xL Zellen. An den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ergebnissen lässt sich dieser Widerspruch nicht hinreichend erklären. Ältere Studien haben jedoch bereits gezeigt,

dass die Interleukin 8 Produktion JNK-vermittelt stattfindet<sup>53</sup> und dass der Nachweis der Interleukin 8-Produktion im Rahmen der Fas-Stimulation indirekt auf eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges schließen lässt<sup>49</sup>. Eine mögliche Ursache der JNKII-supprimierten Interleukin 8-Produktion könnte somit in der hohen Konzentration des verwendeten JNKII liegen, welches hierbei nicht nur selektiv den JNK-Signalweg hemmt, sondern auch Einfluss auf andere Signalwege wie z. B. den NF- $\kappa$ B Signalweg nehmen könnte, durch dessen Hemmung sich die Suppression des Interleukin 8 erklären ließe. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch den in Abb. 9a dargestellten Anstieg der Interleukin 8-Produktion bei Reduktion der JNKII-Konzentration von 40  $\mu$ M auf 20  $\mu$ M. Eine weitere mögliche Erklärung der dargestellten Ergebnisse könnte darin bestehen, dass in den Colo357 Bcl-xL Zellen die gleichzeitige Aktivierung des JNK- wie auch des NF- $\kappa$ B Signalweges zur Produktion von Interleukin 8 obligat ist, sodass durch die Hemmung eines dieser beiden Signalwege trotz der Aktivierung des Anderen kein Anstieg der Produktion von Interleukin 8 stattfindet. Dies steht jedoch ebenfalls im Widerspruch mit der anfangs diskutierten, JNK-unabhängigen Interleukin 8 Produktion. In einer Studie aus dem Jahr 2003<sup>54</sup> wurde dieser Mechanismus bereits an durch mechanische Dehnung stimulierten humanen Alveolarzellen nachgewiesen. Eine dahingehend weitere Untersuchung war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

## **5 Zusammenfassung**

Fas (Apo-1/CD95) ist ein Mitglied der TNF (Tumor Necrosis Factor)-Familie, dass über die rezeptoreigene Todesdomäne Caspase 8-vermittelt Apoptose induzieren kann. Dies geschieht entweder auf direktem Wege durch Aktivierung von Caspase 3 oder durch die zusätzliche, für den Untergang der Zellen essentiellen Stimulation des intrinsischen mitochondrialen Signalwegs. Abhängig von der jeweiligen Art der Apoptoseinduktion werden Zellen somit in Typ I oder Typ II unterteilt. Durch das Vorhandensein von antiapoptotischen Proteinen wie unter anderem Bcl-xL kann in Letzterem negativ regulierend auf den Signalweg eingegriffen werden (siehe Abb. 3). Während der Aktivierung des Fas-Signalweges kommt es zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK, p38-MAPK und ERK; dies alleine ist jedoch nicht ausreichend für die Induktion des Zelltodes und findet ebenfalls in apoptoseresistenten Zellen statt. Weiterhin wurde bei der Regulation entzündlicher Prozesse eine Beteiligung von Fas beschrieben<sup>18</sup>. Bedingt durch die hohe Dichte an Fas und seinem Liganden FasL auf T-Zellen nimmt es durch Apoptoseinduktion auf T-Zellen selbst oder deren Zielzellen indirekt auf verschiedene Formen entzündlicher oder immunregulatorischer Prozesse wie beispielsweise die Transplantatabstoßung Einfluss.

Seit vielen Jahren ist zudem bekannt, dass durch die Aktivierung des Fas-Signalweges auch nichtapoptotische Signalwege induziert werden können. Beispielhaft hierfür steht der NF- $\kappa$ B-Signalweg, welcher letztendlich zur Transkription antiapoptotischer Zielgene führt. Auch hierbei kommt es Caspase 8-vermittelt zur Phosphorylierung von JNK, p38-MAPK und ERK, weiterhin scheint eine Aktivierung dieses Signalweges in Zusammenhang mit einer erhöhten Produktion von Interleukin 8 zu stehen<sup>49</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich nun gezeigt, dass die Aktivierung von Fas sowohl durch die Aktivierung von Caspase 8 als auch durch unabhängige Mechanismen zur Aktivierung von JNK führt. Hierbei wurde durch Stimulation der apoptosesensiblen T-Zelllinie Jurkat mit dem vorvernetzten FasL die Phosphorylierung von JNK bei nativen

Zellen ebenso wie mit dem Caspaseinhibitor zVAD vorbehandelnden Zellen nachgewiesen.

Des Weiteren konnte in den wenig apoptosesensitiven KB-Zellen sowie in den transfizierten und somit apoptoseresistenten Colo 357 Bcl-xL Zellen ein caspaseabhängiger, jedoch apoptoseunabhängiger Signalweg zur Aktivierung von JNK nachgewiesen werden. Dieses Phänomen scheint vom Zelltyp abhängig zu sein. Die Stimulation der Colo 357 Bcl-xL Zellen führte nach Vorbehandlung mit CHX, das eine Todesrezeptor-vermittelte, verstärkte Caspase 8-Aktivierung bewirkt, zur Aktivierung von JNK, während im simultan durchgeführten Zytotoxizitätstest das Überleben der Zellen bestätigt werden konnte. Bei Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD konnte in den Colo 357 Bcl-xL Zellen kein phosphoryliertes JNK nachgewiesen werden, während in den KB-Zellen eine Aktivierung von JNK bei reduzierter Konzentration von zVAD mit jedoch bestehendem Apoptoseschutz, graduell stattfand.

Zuletzt wurde der Einfluss der JNK-Aktivierung auf die Interleukin 8 Produktion untersucht. Hierzu wurde die Interleukin 8 Produktion bei Colo 357 Bcl-xL Zellen unter Stimulation mit FasL gemessen und mit der Produktion nach Vorbehandlung mit zVAD verglichen. Hierbei zeigte sich eine unveränderte Produktion von Interleukin 8, was einen JNK-unabhängigen Weg postuliert, da JNK, wie im Vorversuch gezeigt, in dieser Zelllinie durch zVAD inhibiert wird. Unter Zugabe des JNK-spezifischen Inhibitors JNKII kommt es jedoch zu einer deutlichen, aber Konzentrations-abhängigen Suppression der Interleukin 8 Produktion, was in direktem Widerspruch zu dem vorab bestehenden Ergebnis steht. Möglicherweise führt eine erhöhte Konzentration von JNKII zu einer Hemmung zusätzlicher Signalwege wie beispielsweise der des NF- $\kappa$ B-Signalweges, was indirekt zu einer Beeinflussung der Interleukin 8-Produktion führt. Weiterhin könnte eine obligat gemeinsame Aktivierung des JNK und des NF- $\kappa$ B-Signalweges zur Interleukin 8 Produktion notwendig sein. Leider war aus Zeitgründen eine Klärung dieser Problematik nicht abschließend möglich.



## **6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis**

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Wajant, H., Gerspach, J. & Pfizenmaier, K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**, 55–76 (2005).
2. Wajant, H. in *Fas Signaling* 69–96 (Springer US, 2006). at <[http://dx.doi.org/10.1007/0-387-34573-6\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/0-387-34573-6_6)>
3. Peter, M. E. *et al.* The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* **129**, 447–450 (2007).
4. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 53–66 (2003).
5. Lee, K.-H. *et al.* The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* **25**, 1009–1023 (2006).
6. Barnhart, B., Alappat, E. & Peter, M. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.* **15**, 185–93 (2003).
7. Tanaka M, Suda T, Takahashi T & Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* **14**, 1129–35 (1995).
8. Schneider, P. *et al.* Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *The Journal of Experimental Medicine* **187**, 1205–1213 (1998).
9. Itoh, N. & Nagata, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 10932–10937 (1993).
10. Fesik, S. W. Insights into Programmed Cell Death through Structural Biology. *Cell* **103**, 273–282 (2000).

11. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 11445–11450 (2003).
12. Siegel, R. M. *et al.* Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations. *Science* **288**, 2354–2357 (2000).
13. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776 (2000).
14. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505–512 (1995).
15. Donepudi, M., Sweeney, A. M., Briand, C. & Grütter, M. G. Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Molecular Cell* **11**, 543–549 (2003).
16. Peter, M. E. & Krammer, P. H. The CD95(APO-1//Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**, 26–35 (2003).
17. Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation... [Structure. 2002] - PubMed - NCBI. **10**, 285–8 (2002).
18. Green, D. R. & Ferguson, T. A. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 917–924 (2001).
19. Takeuchi, T. *et al.* Accelerated Rejection of FAS Ligand-Expressing Heart Grafts. *The Journal of Immunology* **162**, 518–522 (1999).
20. Kang SM *et al.* Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med.* **3**, (1997).
21. Seino, K. *et al.* Cutting Edge: Chemotactic Activity of Soluble Fas Ligand Against Phagocytes. *The Journal of Immunology* **161**, 4484–4488 (1998).
22. Ottonello, L., Tortolina, G., Amelotti, M. & Dallegri, F. Soluble Fas Ligand Is Chemotactic for Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes. *The Journal of Immunology* **162**, 3601–3606 (1999).
23. Behrens, C. K., Igney, F. H., Arnold, B., Möller, P. & Krammer, P. H. CD95 Ligand-Expressing Tumors Are Rejected in Anti-Tumor TCR Transgenic Perforin Knockout Mice. *The Journal of Immunology* **166**, 3240–3247 (2001).

24. Cinatl, J. *et al.* Decreased Neutrophil Adhesion to Human Cytomegalovirus-Infected Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by Virus-Induced Up-Regulation of Fas Ligand Independent of Neutrophil Apoptosis. *The Journal of Immunology* **165**, 4405–4413 (2000).
25. Greenstein, S., Barnard, J., Zhou, K., Fong, M. & Hendeby, B. Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology* **68**, 715–722 (2000).
26. Hendeby, B., Zhu, C. L. & Greenstein, S. Fas activation opposes PMA-stimulated changes in the localization of PKC $\delta$ : a mechanism for reducing neutrophil adhesion to endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology* **71**, 863–870 (2002).
27. Silverman, N. & Maniatis, T. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Development* **15**, 2321–2342 (2001).
28. Ghosh, S. & Karin, M. Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. *Cell* **109**, S81–S96 (2002).
29. Karin, M. & Lin, A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221–227 (2002).
30. Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T. & Baltimore, D. Constitutive NF- $\kappa$ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes & Development* **9**, 2736–2746 (1995).
31. Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. & Verma, I. M. Suppression of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* **274**, 787–789 (1996).
32. Baldwin, A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest* **107**, 241–246 (2001).
33. Oberst, A. & Green, D. R. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 757–763 (2011).
34. Chan, F. K.-M. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* **37**, 101–107 (2007).
35. Gustafsson, Å. B. & Gottlieb, R. A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **292**, C45–C51 (2007).

36. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
37. Suzuki, M., Youle, R. J. & Tjandra, N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* **103**, 645–654 (2000).
38. Huang, D. C. . & Strasser, A. BH3-Only Proteins—Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell* **103**, 839–842 (2000).
39. Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* **7**, 683–694 (2001).
40. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science* **288**, 1053–1058 (2000).
41. Wang, H.-G. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339–343 (1999).
42. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell* **87**, 619–628 (1996).
43. Bruick, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9082–9087 (2000).
44. Regula, K. M., Ens, K. & Kirshenbaum, L. A. Inducible Expression of BNIP3 Provokes Mitochondrial Defects and Hypoxia-Mediated Cell Death of Ventricular Myocytes. *Circulation Research* **91**, 226–231 (2002).
45. Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. & Strasser, A. The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell* **3**, 287–296 (1999).
46. Cheng, E. H.-Y. *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like Death Effector by Caspases. *Science* **278**, 1966–1968 (1997).
47. Clem, R. J. *et al.* Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 554–559 (1998).

48. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* **72**, 847–855 (2002).
49. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. NF-[kappa]B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**, 301–310 (2002).
50. Wilson, D. J. *et al.* JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 989–994 (1996).
51. Lenczowski, J. M. *et al.* Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 170–181 (1997).
52. Smith A. D., Datta S. P., Howard Smith G., Campbell P. N., Bentley R., McKenzie H. A. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press (1997).
53. Li, D. Q. *et al.* JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res.* **82**, 588–596 (2006).
54. Li, L.-F. *et al.* Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal and nuclear factor- $\kappa$ B-inducing kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **285**, 464–475 (2003).

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von Fas.....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der Caspase 8-Aktivierung durch Fas.....	5
Abb. 3: Fas-induzierte Apoptoseinduktion.....	8
Abb. 4: Schematische Darstellung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion durch Fas.....	11
Abb. 5: Stimulation mit FasL/ M2 führt in Jurkat Zellen zur Aktivierung von JNK, ERK und Caspase 8.....	30
Abb. 6a+b: In KB-Zellen kommt es auch unter Apoptoseschutz durch zVAD zur Aktivierung von JNK.....	32
Abb. 7a: In apoptoseresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen lässt sich unabhängig vom Zelltod die Aktivierung von JNK, p38 und ERK nachweisen.....	34
Abb. 7b: In apoptoseresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen lässt sich unabhängig vom Zelltod die Aktivierung von JNK, p38 und ERK nachweisen.....	35
Abb. 8a+b: Durch Stimulation mit FasL/ M2 und TRAIL kommt es in apoptoseresistenten Colo357 Bcl-xL Zellen nicht zu einer Aktivierung von PARP, jedoch zu einer Prozessierung von Caspase 8.....	37
Abb. 9a+b: Die Hemmung der JNK-Aktivierung durch JNKII in Colo357 Bcl-xL Zellen führt zu einer Verminderung der IL8-Produktion, während die alleinige Stimulation mit FasL/ M2 die IL8-Produktion deutlich anhebt.....	39

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Harald Wajant für die geduldige Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Wicovsky danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete Anleitung zum praktischen und theoretischen Arbeiten im Labor, für seine stete Ansprechbarkeit und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

# CURRICULUM VITAE

## **Persönliche Informationen**

- Name: Barbara Klingler
- Geburtsdatum: 5. August 1982
- Geburtsort: Ochsenfurt
- Nationalität: Deutsch

## **Schulbildung**

05/2001: Abitur am Siebold-Gymnasium Würzburg

## **Studium und beruflicher Werdegang**

10/2001 - 05/2008: Cand. Med. der medizinischen Fakultät der Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

08/2003: Ärztliche Vorprüfung

05/2008: 2. Ärztliche Prüfung

05/2008: Erhalt der Approbation

Datum: 08.10.2014

Barbara Klingler