

**The apoptosis-regulator c-FLIP  
- functional role in urothelial carcinoma and autoimmunity, and  
identification of novel CD95 DISC-interacting proteins**

Frida Kerstin Elisabeth Ewald, M. Sc.

**Summary**

Elimination of unwanted or damaged cells through apoptosis is critical during the embryonic development, in the immune system and to maintain tissue homeostasis in multicellular organisms. Apoptosis is strictly regulated by pro- and anti-apoptotic proteins. c-FLIP proteins inhibit death receptor-mediated apoptosis at the death-inducing signalling complex (DISC) by preventing processing of caspase-8. The aim of this thesis is to gain a better understanding of c-FLIP proteins' role in disease and to examine if there are unknown DISC-interacting proteins which could give a better insight into the complex signalling of the CD95 receptor.

Deregulation of apoptosis is common in cancer and is often caused by overexpression of anti-apoptotic proteins in tumour cells. The role of c-FLIP splice variants c-FLIP<sub>L</sub> and c-FLIP<sub>S</sub> in urothelial carcinoma was examined in this thesis. Unexpectedly, the c-FLIP<sub>L</sub> isoform was down-regulated in urothelial carcinoma tissues as well as in established carcinoma cell lines compared with normal urothelial tissues and cells, whereas c-FLIP<sub>S</sub> was unchanged. Nevertheless, both overexpression and knock-down through RNA interference of c-FLIP isoforms demonstrated that c-FLIP proteins, particularly c-FLIP<sub>L</sub>, are central resistance factors against CD95- and TRAIL-mediated apoptosis in urothelial tumours.

Non-apoptotic functions of CD95 DISC-interacting proteins have been described, including NF- $\kappa$ B activation, proliferation and T cell activation. However, the signalling mechanisms and how these proteins switch between apoptotic and survival signalling are not clear. The CD95 DISC was analysed by mass spectrometry to gain further insights into the DISC composition and the influence of c-FLIP<sub>L</sub>. Interestingly, TRAF2 and RIP1 were recruited to the DISC in a c-FLIP<sub>L</sub>-dependent manner. Moreover, the novel CD95 DISC-binding protein A20 was identified and its DISC interaction was verified by Western blotting.

c-FLIP<sub>R</sub> is the solely short c-FLIP isoform expressed in mice. Endogenous c-FLIP<sub>R</sub> was induced upon T cell stimulation with kinetics similar to c-FLIP<sub>S</sub> in humans. The mouse model vavFLIP<sub>R</sub> with constitutive expression of murine c-FLIP<sub>R</sub> was used to examine the functional role of c-FLIP<sub>R</sub> in the immune system. Lymphocytes from vavFLIP<sub>R</sub> mice were protected against CD95-mediated apoptosis, thus confirming functional c-FLIP<sub>R</sub> expression. Increased memory and diminished naïve T cell populations were identified in one-year-old vavFLIP<sub>R</sub> mice in comparison to wild-type mice. Moreover, higher levels of kidney damage and elevated autoantibody titers were observed in vavFLIP<sub>R</sub> animals compared with wild-type littermates, suggesting a mild lupus-like phenotype of vavFLIP<sub>R</sub> mice.

**The apoptosis-regulator c-FLIP  
- functional role in urothelial carcinoma and autoimmunity, and  
identification of novel CD95 DISC-interacting proteins**

Frida Kerstin Elisabeth Ewald, M. Sc.

**Zusammenfassung**

Apoptose ist ein essentieller Mechanismus in der embryonalen Entwicklung und in der zellulären Homöostase von multizellulären Organismen, der unerwünschte oder geschädigte Zellen entfernt. Im Immunsystem ist die Apoptose wichtig für die negative Selektion von T-Zellen in Thymus und auch für die Eliminierung von Effektor T-Zellen nach erfolgreicher Beseitigung von Antigenen. Die Apoptose ist durch pro- und anti-apoptotische Proteine streng reguliert. c-FLIP Proteine inhibieren die Todesrezeptor-induzierte Apoptose am DISC Komplex (*death-inducing signalling complex*) dadurch, dass sie die Caspase-8 Spaltung verhindern.

Apoptose ist häufig bei Krebserkrankungen dereguliert, was durch Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen verursacht werden kann. In dieser Arbeit wird die Rolle der c-FLIP Spleißvarianten c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>S</sub> in Urothelkarzinomen untersucht. Überraschenderweise wurde im Vergleich zu normalem Gewebe und Zellen eine verminderte Expression von c-FLIP<sub>L</sub> in Urothelkarzinomgewebe, sowie auch in etablierten Karzinom-Zelllinien beobachtet. Die c-FLIP<sub>S</sub> Expression war jedoch unverändert. Dennoch zeigte sowohl die Überexpression, als auch der RNA Interferenz-vermittelte *Knock-down* der c-FLIP Isoformen, dass c-FLIP Proteine, insbesondere c-FLIP<sub>L</sub>, wichtige Resistenzfaktoren bei der CD95- und TRAIL-vermittelten Apoptose in diesem Zelltyp sind. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine hohe c-FLIP Expression den NF-κB Signalweg inhibieren kann. Ferner kann aber auch der CD95 Signalweg für das Tumorwachstum wichtig sein. Wahrscheinlich müssen deshalb Urothelkarzinomzellen die c-FLIP-expression genau so abstimmen, dass zwar die extrinsische Apoptose verhindert wird, aber begünstigende Effekte nicht gehemmt werden. Daher könnte c-FLIP, insbesondere c-FLIP<sub>L</sub>, ein Ziel für eine Apoptose-basierte Behandlung von Urothelkarzinomen werden und unterstützend bei der Behandlung von resistenten Tumoren eingesetzt werden.

Desweiteren wurden auch nicht-apoptotische Funktionen von CD95 DISC-interagierenden Proteinen, sowie NF-κB-Aktivierung, Zellproliferation und T-Zell-Aktivierung beschrieben. Dennoch ist es nicht eindeutig, wie diese Proteine zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Signalwegen wechseln können. Der CD95-DISC wurde in dieser Arbeit mittels Massenspektrometrie analysiert, um weitere Erkenntnisse über die DISC Zusammensetzung

**The apoptosis-regulator c-FLIP**  
**- functional role in urothelial carcinoma and autoimmunity, and**  
**identification of novel CD95 DISC-interacting proteins**

Frida Kerstin Elisabeth Ewald, M. Sc.

und den Einfluss von c-FLIP<sub>L</sub> auf diese Zusammensetzung zu gewinnen. Mit Hilfe dieser Analysen konnte in Jurkat-Zellen festgestellt werden, dass die Proteine CD95, Caspase-8 und Caspase-10 den Kern des CD95 DISC bilden. Auffallend ist, dass das Adapterprotein FADD nicht detektiert werden konnte, obwohl Caspase-8 und -10 nur über FADD an den DISC binden können. Für den CD95 DISC in c-FLIP<sub>L</sub> überexprimierenden Jurkat-Zellen waren CD95, FADD, Caspase-8, c-FLIP<sub>L</sub> und TRAF2 die Grundbestandteile des Komplexes. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte festgestellt werden, dass TRAF2 und RIP1 abhängig von c-FLIP<sub>L</sub> zum DISC rekrutiert werden. Weiterhin konnte das Protein A20 als ein neues CD95-DISC-interagierendes Protein identifiziert werden, das bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die DISC-Interaktion konnte durch Western-Blot-Analysen bestätigt werden.

c-FLIP<sub>R</sub> ist die einzig mögliche kurze c-FLIP Spleißvariante in Mäusen. Nach T-Zell-Stimulation wurde endogenes c-FLIP<sub>R</sub> mit einer Kinetik detektiert, die vergleichbar mit c-FLIP<sub>S</sub> in humanen Zellen ist. Dies weist darauf hin, dass murines c-FLIP<sub>R</sub> eine Funktion in der Aktivierungsphase von Immunantworten haben könnte. Um die Funktion von c-FLIP<sub>R</sub> im Immunsystem zu untersuchen, wurde das Mausmodell vavFLIP<sub>R</sub>, in dem murines c-FLIP<sub>R</sub> konstitutiv in hematopoietischen Zellen exprimiert wird, benutzt. Tatsächlich waren vavFLIP<sub>R</sub>-Lymphozyten sowohl gegenüber CD95-vermittelter Apoptose als auch gegen AICD (*activation-induced cell death*) geschützt und somit konnte die Expression von funktionellem c-FLIP<sub>R</sub> bestätigt werden. In jungen Mäusen waren nicht nur die Organgrößen, sondern auch die B- und T-Zellpopulationen unverändert. Dahingegen zeigten ein Jahr alte vavFLIP<sub>R</sub> Mäuse erhöhte Gedächtnis- und verminderte naive T-Zell-Frequenzen im Vergleich mit Wildtyp Mäusen. Weiterhin wiesen die ein Jahr alten vavFLIP<sub>R</sub> Mäuse mehr Nierenschädigungen und einen im Serum erhöhten Autoantikörpertiter aus, als die Wildtyp Mäuse. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass vavFLIP<sub>R</sub> Mäuse einen Lupus-ähnlichen Phänotyp entwickeln.