

## Summary

Skin cancers, like squamous cell carcinoma (SCC), which belongs to the most frequent tumors world wide, require novel strategies for treatment, since most malignant cancer cells resist current anti-tumour agents. In the recent years cytokines, such as TRAIL or CD95L, that activate apoptotic death receptor signalling pathways as well as synthetic compounds like poly (I:C) that may activate Toll-like receptor-3 (TLR3)-mediated cell death signalling pathways are discussed as potential targets for anti-tumour therapy. Overcoming apoptosis resistance of tumor cells is of paramount importance for the development of novel therapeutic strategies for specific elimination of cancer cells. However, many cancer cells resist apoptotic stimuli by up-regulation of anti-apoptotic proteins such as cFLIP, IAPs and Bcl-2. cIAPs were postulated as crucial inhibitors of TLR3- as well as CD95-induced apoptosis but the mechanisms as well as proof of this hypothesis are lacking to date. The goal of this thesis was to contribute to the understanding of the functional relevance of IAPs for the regulation of TLR3- and DR-mediated cell death and non-apoptotic signalling pathways in primary keratinocytes and SCC cells.

This work has demonstrated that cIAPs protect HaCaT keratinocytes from poly (I:C)- and CD95L-induced cell death by inhibition of both caspase and RIP-1-kinase activities. Interestingly, cIAPs inhibit the formation of an intracellular RIP-1 signalling complex, which consists of caspase-8, RIP-1 cFLIP, and FADD. This RIP-1 complex is necessary, but insufficient for induction of cell death. Upon TLR3 stimulation in the absence of cIAPs thus RIP-1 complex is binding to TRIF, and promotes enhanced apoptosis. However, inhibition of caspase-8 activity in this complex by chemical inhibitors (such as zVAD-fmk or QVD) or by overexpression of cFLIP<sub>S</sub> (a prominent caspase-8 interacting molecule and inhibitor) unmasks a necrotic form of cell death. In this pro-necrotic complex substantial accumulation of RIP-1 was observed, although this necrotic cell death was fully blocked by inhibition of RIP-1 kinase activity. Loss of RIP-1 in this complex mediated by specific shRNA protects cells from poly (I:C)/IAP antagonist and CD95L/IAP antagonist induced cell death.

However, cells expressing high levels of cFLIP<sub>L</sub> are resistant to poly (I:C) and CD95L-induced apoptosis in the absence of cIAPs. Interestingly the long isoform cFLIP<sub>L</sub>, but not the short isoform cFLIP<sub>S</sub> conferred protection from IAP antagonist induced RIP-1-kinase-dependent necrotic cell death. Furthermore, degradation of cIAPs, induced by TWEAK signalling, duplicates findings with the IAP antagonist and shows the physiological relevance of cIAPs for the regulation of RIP-1 dependent cell death signalling pathways.

Studies of primary keratinocytes showed equal levels of sensitivity to TLR3-induced apoptosis of primary and immortalised keratinocytes (HaCaT). The IAPs protect these cells from TLR3-induced cell death by inhibition of both caspase and RIP-1-kinase activities. Intriguingly, the downregulation of RIP-1 in primary keratinocytes conferred no protection, but switches TLR3-induced cell death from apoptotic to necrotic cell death. Further inhibition of caspase activities by zVAD-fmk increases non-apoptotic cell death in RIP-1 knockdown primary keratinocytes and this cell death can only partially be blocked by Necrostatin-1. Therefore poly (I:C) treated keratinocytes die in the absence of cIAPs in a caspase- and RIP-1-independent cell death and this cell death may be regulated by currently unknown factors. TLR3 and DRs can also activate pro-survival NF- $\kappa$ B and MAPK dependent signalling pathways that promote resistance to cell death stimuli and therefore induce carcinogenesis. In this study it was also found that IAPs block spontaneous activation of both canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B activation pathways in primary and SCC cell lines. TRAIL-induced signalling suppresses the spontaneous non-canonical NF- $\kappa$ B activation, induced by the absence of IAPs in primary and SCC keratinocytes. As well, TRAIL-induced canonical NF- $\kappa$ B activation was downregulated in the absence of IAPs. In contrast to NF- $\kappa$ B pathways, the MAPKs were not auto-activated upon IAP depletion, although TRAIL-induced p38 activation in the absence of IAPs was increased in cancer cells, unlike HaCaT and primary keratinocytes. TRAIL-induced JNK activation is not influenced by IAPs. Taken together, the results of this study implicate cIAPs as crucial negative regulators of TLR3 and CD95 cell death signalling by modulation of RIP-1. Moreover, IAPs are critical inhibitors of both canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signalling. Furthermore, TWEAK signalling may modulate RIP-1-dependent necrosis, induced by different stimuli. Simultaneous treatment with IAP antagonists and pro-apoptotic stimuli, like TLR3- or DR-agonists, could thus be an interesting strategy for future anticancer therapy and may impact also anti-tumour immune response.

# Zusammenfassung

Hautkrebs, wie das Plattenepithelkarzinom (SCC), gehört zu den weltweit am meist verbreiteten Tumorerkrankungen der Haut. Die Entwicklung von neuen Strategien zur Behandlung dieses Hautkrebses ist notwendig, da eine Vielzahl von Krebszellen Resistenzen gegenüber bekannten Anti-Tumor-Therapien zeigen. In den vergangenen Jahren wurden Zytokine, wie TRAIL und CD95L, die apoptotische Signalwege durch Aktivierung von Todesrezeptoren (TR) als auch synthetische Komponenten, wie Poly (I:C), die Toll-like-Rezeptor-3 (TLR3)-vermittelte Zelltodsignalwege initiieren können, als potentielle Zielstrukturen für Antitumortherapien diskutiert. Die Überwindung von Apoptoseresistenz von Tumorzellen ist dabei von höchster Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur spezifischen Eliminierung von Krebszellen. Viele Tumorzellen zeigen Resistenzen gegenüber apoptotischen Stimuli durch Aufregulierung zentraler anti-apoptotischer Proteine, wie cFLIP, IAPs und Bcl-2 Proteinen. cIAPs wurden als kritische Inhibitoren für die TLR3- und CD95-induzierte Apoptose postuliert, wobei sowohl diese Resistenzmechanismen bisher nicht genau bekannt sind, als auch die detaillierte Überprüfung dieser Hypothese zum jetzigen Zeitpunkt noch aussteht. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung der funktionellen Relevanz von IAPs für die Regulierung des TLR3- und CD95-vermittelten Zelltods sowie der Bedeutung der cIAPs für die nicht-apoptotische Signalgebung in primären Keratinozyten und SCC Zellen.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass cIAPs HaCaT Keratinozyten gegenüber Poly (I:C)- und CD95L-induzierte Zelltodinduktion durch Inhibition von Caspase- und RIP-1-Kinase-Aktivitäten schützen. Interessanterweise inhibieren cIAPs die Formierung eines intrazellulären RIP-1 Signalkomplexes, der Caspase-8, RIP-1, cFLIP und FADD Moleküle beinhaltet. Dieser RIP-1 Komplex ist nicht in der Lage Zelltod zu induzieren. Nach Stimulation des TLR3 in der Abwesenheit der cIAPs kommt es zur Bindung des RIP-1 Komplexes an TRIF, wodurch Apoptose gefördert und verstärkt wird. Die Inhibition der Caspase-Aktivität in diesem Komplex durch chemische Caspaseinhibitoren, wie zVAD-fmk oder QVD, oder durch Überexpression von cFLIP<sub>S</sub> (ein bekannter Caspase-8-Interaktionspartner und -Inhibitor) führte zum Nachweis eines nekrotischen Zelltods. In diesem Nekrose-fördernden Komplex wurde eine substantielle Akkumulation von RIP-1 beobachtet. Durch die Inhibition der RIP-1-Kinase Aktivität durch Necrostatin-1 in diesem Komplex kann die Poly (I:C)/IAP Antagonist geförderte Nekrose gehemmt werden. Auch der Verlust von RIP-1 in diesem Komplex, beispielsweise vermittelt durch spezifische shRNA, schützt die Zellen gegenüber Poly (I:C)/IAP Antagonist und gegenüber CD95L/IAP Antagonist induzierten Zelltods. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von cFLIP<sub>L</sub> mit Resistenz gegenüber Poly (I:C)- und CD95L-induzierter Apoptose auch in Abwesenheit von cIAPs einhergeht. Interessanterweise schützt cFLIP<sub>L</sub>, jedoch nicht cFLIP<sub>S</sub>

vor dem IAP Antagonisten-induzierten RIP-1-Kinase-abhängigen nekrotischen Zelltod. Die physiologische Bedeutung der cIAPs für die Regulation von RIP-1-abhängigen Zelltodsignalwegen wird durch Experimente mit TWEAK deutlich. TWEAK bewirkt die Degradation von cIAPs und diese Experimente konnten die gefundenen Resultate mit dem IAP Antagonisten bezüglich der Mechanismen der Zelltodinduktion bestätigen.

Studien mit primären Keratinozyten konnten eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber TLR3-induzierte Apoptose von primären und immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) zeigen. Auch hier schützen IAPs die Zellen gegenüber TLR3-induziertem Zelltod durch Inhibition von Caspase- und RIP-1-Kinase-Aktivitäten. Im Gegensatz zu HaCaT-Zellen führt eine Verminderung der RIP-1 Expression in primären Keratinozyten nicht zu einer Protektion des IAP Antagonist/Poly(I:C)-vermittelten Zelltods, sondern zu einem Wechsel von apoptotischem zum nekrotischem Zelltod. Ein weiterer Unterschied in der Todessignalgebung in primären Keratinozyten besteht darin, dass die Inhibition von Caspaseaktivitäten (mittels zVAD-fmk) in RIP-1-knockdown Zellen zu einer verstärkten Induktion des nicht-apoptotischen Zelltods führt, der aber nur teilweise durch Necrostatin-1 inhibiert werden kann. Demnach sterben Poly(I:C)-behandelte Keratinozyten in der Abwesenheit von cIAPs durch einen Caspase- und RIP-1-unabhängigen Zelltod und dieser Zelltod wird wahrscheinlich durch bisher noch nicht bekannte Faktoren reguliert.

TLR3 und TRs können auch überlebensfördernde NF- $\kappa$ B- und MAPK-abhängige Signalwege aktivieren, die Resistenzen gegenüber Zelltodstimuli und damit die Karzinogenese von Hautzellen fördern. In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass IAPs die spontane Aktivierung der kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Aktivierung in primären Keratinozyten und in SCC-Zellen hemmen. Des Weiteren wird die spontane nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Aktivierung der TRAIL-vermittelten Signalkaskade in der Abwesenheit von cIAPs in primären Keratinozyten und SCC Zellen unterdrückt. Die TRAIL-induzierte kanonische NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird ebenfalls in der Abwesenheit von cIAPs vermindert. Im Gegensatz zum NF- $\kappa$ B Signalweg, werden die MAPK nach IAP Depletion nicht autoaktiviert. Eine Steigerung der p38 Aktivierung in der Abwesenheit der IAPs und nach TRAIL Stimulation wurde in MET1 und A5RT3 SCC Zellen, jedoch nicht in HaCaT Zellen und primären Keratinozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu wird die TRAIL-induzierte JNK Aktivierung nicht von IAPs beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Studie zeigen somit, dass cIAPs durch Modulation der Funktion von RIP-1 TLR3- und CD95-Zelltodsignalwege negativ regulieren. Die cIAPs sind aber auch bedeutende Inhibitoren kanonischer und nicht-kanonischer NF- $\kappa$ B Signalgebung. Des Weiteren kann die kombinierte Signalgebung von TWEAK und anderen Stimuli die RIP-1-abhängige Nekrose modulieren. Die simultane Behandlung mit IAP Antagonisten und pro-apoptotischen Stimuli, wie zum Beispiel TLR3- oder TR-Agonisten,

könnte eine Strategie für Antitumorthérapien darstellen, die auch für die antitumorale Immunantwort bedeutsam sein könnte.