

## Summary

The worldwide increasing incidence of skin-derived cancer and their diversity requires development of novel therapeutic strategies. The malignant melanoma, for example, is a highly aggressive cancer with the capacity to metastasize at early stages. Together with resistance to chemotherapeutic agents it results in overall poor prognosis of melanoma patients once metastasis has occurred. Death receptor-induced cell death may represent an innovative therapeutic approach for the specific elimination of skin tumor cells. Activation of death receptors leads to induction of several apoptotic and non-apoptotic signaling pathways, which are regulated in a complex manner by different proteins. In this context cIAP1 and cIAP2 were recently described to play a substantial role in resistance to extrinsic, in particular for TNF-induced, cell death. This study shows that cIAPs are essential to prevent CD95-mediated cell death. Loss of cIAPs caused by a chemical IAP antagonist leads to dramatic sensitization of skin tumor cells to CD95 ligand. The cell death mediated by CD95 and IAP antagonist is neither entirely caspase-dependent nor caspase-independent. Only a combination of caspase and RIP1 kinase inhibition is sufficient to block CD95-mediated cell death in absence of cIAPs. RIP1 is a known target of cIAP activity. Here it is demonstrated that cIAPs inhibit recruitment of RIP1 to the CD95 DISC and suppress formation of the secondary receptor-independent complex (complex II). In addition, loss of RIP1 protects cells from IAP antagonist-mediated sensitization to CD95L. These underline that RIP1 is a key regulator of CD95-initiated cell death pathways which is on its part regulated by cIAPs.

cFLIP is a highly efficient anti-apoptotic protein and therefore also an important regulator of death receptor-mediated cell death. Increased cFLIP expression confers resistance of tumor cells to death ligands and promotes tumor progression. This study shows that cFLIP inhibits death receptor-mediated cell death by limiting activation of the pro-apoptotic molecule Caspase-8 at the DISC. Suppression of cFLIP causes increased Caspase-8 activation at the DISC and is therefore sufficient to sensitize cells to death ligands. Interestingly, it was revealed that cFLIP isoforms differentially contribute to resistance to CD95L in absence of cIAPs. Only cFLIP<sub>L</sub> and not cFLIP<sub>S</sub> interfere with RIP1 recruitment to the DISC and the subsequent formation of the complex II. This protects cFLIP<sub>L</sub>, but not cFLIP<sub>S</sub>, expressing cells from death ligand-induced cell death in absence of cIAPs. This study demonstrates a remarkable and previously unexpected specificity concerning the mechanism of death inhibition by cFLIP isoforms.

These findings provide a new insight in the fundamental roles of cFLIP, cIAPs and RIP1 in regulation of death receptor signaling and may help to develop novel therapeutic approaches to overcome death ligand resistance of skin tumors.

## Zusammenfassung

Das weltweit stark ansteigende Auftreten von Hautkrebs jeglicher Art und die ungenügenden therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten erfordern die Entwicklung neuer therapeutischer Interventionsstrategien. Das maligne Melanom zum Beispiel ist ein hochgradig aggressiver Tumor mit der Fähigkeit relativ früh zu metastasieren. Aufgrund der Aggressivität und der zunehmenden Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen ist das maligne Melanom die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit. Der Todesrezeptor-vermittelte Zelltod könnte ein innovativer Therapieansatz zur spezifischen Eliminierung von Hauttumoren darstellen. Die Aktivierung von Todesrezeptoren führt zur Aktivierung verschiedenster, höchst komplex regulierter apoptotischer und nicht-apoptotischer Signalwege. Im Kontext der Regulierung von Todesrezeptor-induzierten Signalwegen wurden kürzlich cIAP1 und cIAP2 als Resistenzfaktoren des TNF-vermittelten Zelltodes beschrieben. Die vorliegende Studie beschreibt die zentrale Funktion der cIAP Moleküle für die Inhibierung des CD95-vermittelten Zelltodes. Der herbeigeführte Verlust der cIAP's durch einen chemischen IAP Antagonisten, führt zu einer dramatischen Sensitivierung von Hauttumorzellen gegenüber CD95 Ligand. Der durch CD95- und IAP Antagonist-Stimulation herbeigeführte Zelltod der Hauttumorzellen ist weder ausschließlich Caspase abhängig noch Caspase unabhängig. In der Abwesenheit von cIAP's kann ausschließlich die Kombination von Caspase und RIP1 Kinase Inhibitoren die Zellen vor dem CD95-induziertem Zelltod schützen. RIP1 ist ein Todesrezeptor-assoziiertes Molekül und bekanntes Ziel der cIAP Ubiquitinierungsaktivität. Die Studie zeigt, dass die cIAP Moleküle die Rekrutierung von RIP1 in den CD95 Rezeptorkomplex (DISC) inhibieren und somit die Formierung eines sekundären zytoplasmatischen Komplexes (Komplex II) supprimieren. Darüber hinaus ist gezeigt, dass der Verlust von RIP1 Hauttumorzellen vor der IAP Antagonist-vermittelten Sensitivierung gegenüber CD95L schützt. Dieses unterschreibt die Schlüsselrolle des RIP1, welches von cIAP's reguliert wird, in der Regulation von CD95-induzierten Signalwegen.

cFLIP ist ein hoch effizientes anti-apoptotisches Protein und somit auch ein wichtiger Regulator des Todesrezeptor-vermitteltem Zelltodes. Erhöhte Level von cFLIP verleihen Tumorzellen Resistenz gegenüber Todesliganden und fördern somit die Tumor Entwicklung. In der Studie ist gezeigt, dass cFLIP den Todesrezeptor-induzierten Zelltod durch die Inhibierung der Aktivierung des pro-apoptotischen Moleküls Caspase-8 im DISC blockiert. Repression von cFLIP im Gegenzug, bewirkt eine verstärkte Caspase-8 Aktivierung im DISC und ist somit hinreichend zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Todesliganden. Interessanterweise tragen die cFLIP Isoformen in der Abwesenheit von cIAP's

Diplom-Biologe Hupe, Mike

Thema: Apoptotic and non-apoptotic death receptor signaling pathways and their regulation by cFLIP, cIAPs and RIP1 in the skin

unterschiedlich zur Resistenz von Hauttumorzellen gegenüber CD95L bei. cFLIP<sub>L</sub>, aber nicht cFLIP<sub>S</sub>, interferiert mit der Rekrutierung von RIP1 in den DISC und mit der anschließenden Formierung des Komplexes II. Dieses wiederum schützt cFLIP<sub>L</sub>-exprimierende Zellen vor dem Todesliganden-induzierten Zelltod in der Abwesenheit von cIAP's, im Gegensatz zu cFLIP<sub>S</sub>-exprimierende Zellen. Die vorliegende Studie demonstriert eine deutliche und unerwartete Spezifität der cFLIP Isoformen bezüglich des Mechanismus der Inhibition von Zelltod.

Diese Befunde erlauben einen neuen Einblick in die fundamentalen Rollen von cFLIP, cIAPs and RIP1 in die Regulation von Todesrezeptor-vermittelten Signalwegen und helfen möglicherweise bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Beseitigung von Resistenzmechanismen gegen Todesliganden-vermittelten Zelltod in Tumoren der Haut.