

**Master of Science, M. Shyam kavuri**  
**“Molecular analysis of death receptors mediated apoptotic and non-apoptotic signalling pathways in human keratinocytes”**

**Abstract**

Death receptors such as CD95 and TRAIL-R1/R2 induce apoptosis in many cells, but can also activate non-apoptotic signalling pathways (NF- $\kappa$ B as well as mitogen-activated protein kinases (JNK, p38). Different isoforms of FLIP (cFLIP<sub>S</sub> and cFLIP<sub>L</sub>) inhibit different steps in death receptor (DR)-associated activation and maturation of procaspase-8. We reasoned that the cleavage of cFLIP, in turn, could differentially influence nonapoptotic DR signals. Thus, we established stable HaCaT cells expressing different cFLIP isoforms (cFLIP<sub>S</sub>, cFLIP<sub>L</sub>) or mutants of cFLIP<sub>L</sub> that are either uncleavable by caspase-8 (cFLIP<sub>D376N</sub>) or generated after stimulation by DISC-associated caspase-8-mediated cleavage (cFLIP<sub>p43</sub>). All isoforms/mutants of cFLIP<sub>L</sub> blocked death ligand (DL)-mediated apoptosis, whereas a distinct cleavage pattern of caspase-8 was detected in the DISC. Only cells expressing full length cFLIP<sub>L</sub> (irrespective of cFLIP cleavage) sufficiently induced proteolysis of caspase-8 to its p43/41 fragments. In contrast, cFLIP<sub>S</sub> or cFLIP<sub>p43</sub> blocked procaspase-8 cleavage. Furthermore, We examined DR-induced non-apoptotic signals. TRAIL or CD95L activated JNK within 15 minutes. MAPK p38 was induced in a biphasic manner. Interestingly, all cFLIP isoforms/mutants completely inhibited the late DL-induced activation of p38 or JNK. Moreover, cFLIP isoforms or mutants blocked DL-mediated I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, NF- $\kappa$ B activation, and induction of the target gene IL-8. Conversely knockdown of cFLIP isoforms in primary human keratinocytes not only resulted in increased apoptotic cell death but also enhanced DL-induced NF- $\kappa$ B activation and also its target gene IL-8 induction underscoring the physiological relevance of cFLIP for these DL-induced signals. In summary, cFLIP isoforms are not only potent inhibitors of DL-induced apoptosis, but also block DL-triggered activation of NF- $\kappa$ B. The inhibition of non-apoptotic signalling by CD95 and the TRAIL death receptors by FLIP proteins might be of crucial importance during tumorigenesis of keratinocyte skin cancer in order to avoid activation of innate or adaptive immune responses in tumor cells acquiring apoptosis resistance.

**Master of Science, M. Shyam kavuri**  
**“Molecular analysis of death receptors mediated apoptotic and non-apoptotic signalling pathways in human keratinocytes”**

## **Zusammenfassung**

Todesrezeptoren, wie CD95 und TRAIL-R1/R2, können nicht nur Apoptose in vielen Zellen induzieren, sondern aktivieren auch nicht-apoptotische Signalwege (wie NF- $\kappa$ B und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (JNK, p38)). Die FLIP Isoformen (cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>L</sub>) inhibieren verschiedene Schritte der Todesrezeptor (TR)-assoziierten Aktivierung und Prozessierung von Procaspase-8. Wir glauben, dass die Spaltung von cFLIP, die nicht-apoptotische TR-Signalgebung differentiell und bedeutend beeinflusst. Aus diesem Grund wurden HaCaT Zellen etabliert, die verschiedene cFLIP-Isoformen (cFLIP<sub>S</sub>, cFLIP<sub>L</sub>) oder Mutanten von cFLIP<sub>L</sub> stabil exprimieren. Insbesondere wurde die cFLIP<sub>D376</sub>-Mutante, welche von Caspase-8 nicht prozessiert werden kann sowie das DISC-assoziierte Spaltprodukt von cFLIP<sub>L</sub> (cFLIP<sub>p43</sub>) stabil in HaCaT Zellen integriert.

Sowohl die Isoformen als auch die Mutanten von cFLIP<sub>L</sub> inhibieren die Todesligand (TL)-vermittelte Apoptose, wobei ein distinktes Spaltmuster von Caspase-8 im DISC detektiert wurde. Lediglich die Zellen, die die cFLIP<sub>L</sub>-Isoform exprimieren (unabhängig von der cFLIP-Spaltung) induzieren substantiell die Proteolyse von Caspase-8 zum entsprechenden p41/p43 Spaltprodukt. Im Gegensatz dazu inhibieren cFLIP<sub>S</sub> oder cFLIP<sub>p43</sub> die Procaspase-8-Spaltung. Im nächsten Schritt analysierten wir die TR-induzierten nicht-apoptotischen Signalgebungen. Beide TL, TRAIL und CD95L, aktivieren JNK innerhalb von 15 Minuten. Die MAPK p38 wird in biphasischen Schritten aktiviert. Interessanterweise inhibieren alle cFLIP-Isoformen und -Mutanten vollständig die späte TL-induzierte Aktivierung von p38 und JNK. Des Weiteren inhibieren die cFLIP Isoformen und Mutanten die TL-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung, die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und die Induktion des Zielgens IL-8.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die cFLIP Isoformen nicht nur potente Inhibitoren der TL-vermittelten Apoptose sind, sondern auch die TL-vermittelte nicht-apoptotische Signalgebung, wie NF- $\kappa$ B oder MAPK (JNK oder p38), inhibieren. Diese Daten zeigen, dass die Spaltung von cFLIP<sub>L</sub> oder Caspase-8 im DISC weder mit einer verstärkten NF- $\kappa$ B Signalgebung assoziiert ist noch für die inhibitorische Funktion der cFLIP Isoformen in der TR-induzierten NF- $\kappa$ B oder MAPK Aktivierung notwendig ist. Weiterhin lassen die Daten dieser Studie vermuten, dass die cFLIP-Isoformen eine bedeutende Funktion für die Inhibition der TR-induzierten nicht-

**Master of Science, M.Shyam kavuri**  
**“Molecular analysis of death receptors mediated apoptotic and non-apoptotic signalling pathways in human keratinocytes”**

apoptotischen Signale übernehmen. Dieser Mechanismus könnte damit für die Tumorigenese von keratinozytären Hautkrebs von Bedeutung sein und auch eine Erklärung liefern warum maligne Krebsformen die Eliminierung durch die angeborene oder adaptive Immunantwort umgehen können.

**Magdeburg, 22.06.10**

**M.Shyam kavuri**