

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
des Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler

**Immunhistochemische Analysen zur Expression von  
cellular FLICE (FADD-like-IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein (cFLIP)  
in epithelialen und melanozytären Tumoren der Haut**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Judith Weber

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2019

Referent: Priv.-Doz. Dr. Andreas Kerstan

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Apoptose .....	1
1.2 Caspasen .....	1
1.3 Extrinsischer Apoptoseweg .....	3
1.4 Intrinsischer Apoptoseweg .....	5
1.5 Regulation der Apoptose .....	7
1.5.1 cFLIP-Proteine .....	7
1.5.2 Die Rolle von cFLIP bei der Entstehung von Tumoren.....	12
1.6 Fragestellung.....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Material .....	14
2.1.1 Chemikalien .....	14
2.1.2 Geräte und Gebrauchsmaterial .....	15
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	17
2.1.4 Histologische Präparate .....	19
2.1.5 Zelllinien .....	19
2.1.6 Antibiotika.....	19
2.1.7 Zellkulturmedien .....	20
2.1.8 Antikörper .....	20
2.1.8.1 Primärantikörper .....	20
2.1.8.2 Sekundärantikörper.....	21

2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Histologie .....	21
2.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	21
2.2.1.2 Immunhistochemie .....	22
2.2.1.2.1 LSAB-Methode.....	22
2.2.1.2.2 Primärantikörper .....	22
2.2.1.2.3 Optimierung des Färbeprotokolls .....	23
2.2.1.2.4 Färbeprotokoll cFLIP.....	23
2.2.1.2.5 Kontrollen .....	24
2.2.1.2.5.1 Positivkontrolle .....	24
2.2.1.2.5.2 Negativkontrolle.....	24
2.2.1.2.6 Histologische Auswertung .....	25
2.2.2 Zellkultur.....	25
2.2.2.1 Kultivieren und Passagieren der Zelllinien .....	25
2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl .....	26
2.2.2.3 Auftauen der Zelllinien.....	27
2.2.2.4 Einfrieren der Zelllinien .....	27
2.2.2.5 Kultur der Zellen auf ibidi slides.....	28
2.2.3 Western Blot.....	28
2.2.3.1 Herstellung der Zelllysate.....	29
2.2.3.2 SDS-Gelelektrophorese .....	29
2.2.3.3 Membrantransfer .....	29

2.2.3.4 Antikörperdetektion.....	30
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Spezifität des verwendeten Antikörpers .....	31
3.1.1 Western Blot.....	31
3.1.2 Immunhistochemie .....	33
3.2 cFLIP-Expression kutaner Tumoren.....	34
3.2.1 Epitheliale Tumoren.....	34
3.2.2 Melanozytäre Tumoren .....	37
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>40</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>49</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>63</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
AK	aktinische Keratose
ALM	akral-lentiginöses Melanom
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCC	Basalzellkarzinom
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
bp	Basenpaar
BRAF	B rapidly accelerated fibrosarcoma
BSS	buffered salt solution
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CARD	caspase-recruitment domain
Caspase	cysteiny-l-aspartate-specific-protease
CD95	cluster of differentiation 95
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CED-3	Caenorhabditis elegans death gene-3
cFLIP <sub>(S/L/R)</sub>	cellular FLICE-inhibitory protein <sub>(Short/Long/Raji)</sub>

c-IAP	cellular-IAP
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
(d)ATP	(Desoxy-) Adenosintriphsphat
DD	death domain
DED	death effector domain
d.h.	das heißt
(d)H <sub>2</sub> O	(destilliertes) Wasser
Diablo	direct IAP-binding protein with low pI
DISC	death-inducing-signaling-complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate-Buffered Saline
DR	death receptor
ECL	enhanced chemiluminescence
EDA-R	ectodysplasin A receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FADD	Fas-associated death-domain-containing protein
FCS	fötales Kälberserum
FLICE	FADD-like-IL-1 $\beta$ -converting enzyme
× g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gli 2	Glioma associated 2
griech.	griechisch
HaCaT	Keratinocyten-Zelllinie (Human adult low Calcium high Temperature)
HCl	Chlorwasserstoff
H.E.	Hämatoxylin-Eosin



HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
ICE	interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
IE	Injektionseinheiten
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
inkl.	inklusive
KA	Keratoakanthom
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGM	Keratinocyte Growth Medium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LSAB	Labeled-Strept-Avidin-Biotin
M	Mol
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MB	Morbus Bowen
MEK	mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIA	melanoma inhibitory activity
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MLKL	mixed lineage kinase-like protein
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NEA	Non-essential Amino Acid Solution

NFκB	nuclear factor κB
NGF-R	nerve growth factor receptor
NHS	normal horse serum
nm	Nanometer
NM	noduläres Melanom
Omi/HtrA2	high-temperature requirement
PD1	programmed cell death protein 1
PEC	Plattenepithelkarzinom
pH	potentia hydrogenii
PBS	phosphate buffered saline
PEA 15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
PLL	Poly-L-Lysine
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RING	really interesting new gene
RIP 1	receptor-interacting protein 1
RIPK1	receptor-interacting protein kinase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
Tab.	Tabelle
tBid	truncated Bid
TBS-T	Tris buffered saline with tween
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TNS	Trypsin neutralizing solution
TRAF1/2	tumor necrosis factor-receptor-associated-factor 1/2
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt

v.a.	vor allem
vFLIP	viral FLIP
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einleitung

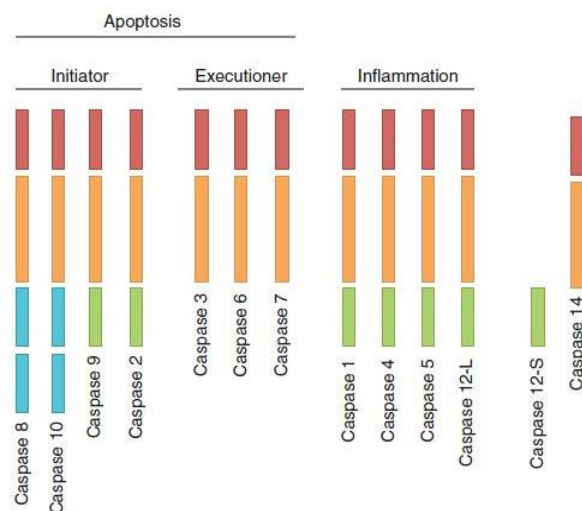
### 1.1 Apoptose

Die gezielte Elimination einzelner Zellen innerhalb eines Zellverbandes ist sowohl während der Embryogenese als auch für die Aufrechterhaltung der Homöostase adulter Organismen unerlässlich (Kerr et al. 1972, Corry und Adams 2002, Elmore 2007). Dieser als Apoptose (griech. *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“) bezeichnete Vorgang stellt ein genetisch determiniertes Programm zur gezielten und entzündungsfreien Beseitigung überflüssiger, beschädigter oder infizierter Zellen dar (Adams 2003). Im Verlauf der Apoptose (Synonym: programmierter Zelltod) kommt es zunächst zu Chromatinkondensierung, Zellschrumpfung, Kernfragmentierung sowie zur Bildung von Ausstülpungen der Zellmembran („membrane blebbing“) mit nachfolgender Ausbildung von Membranvesikeln („apoptotic bodies“) (Kerr et al. 1972, Bredesen 1995, Häcker 2000). Diese werden schließlich von Makrophagen phagozytiert, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Majno und Joris 1995). In Abgrenzung zu dieser sehr geordneten und unter Erhalt der Membranintegrität ablaufenden Form des Zelltods muss die Nekrose (griech. *nekros* „Tod“) betrachtet werden. Hier kommt es im Gegensatz zur Apoptose induziert durch thermische, mechanische oder chemische Schädigung der Zelle sehr früh zu einer Permeabilisierung der Zellmembran sowie zur Anschwellung von Zellkern und Zellorganellen (Bredesen 1995, Majno und Joris 1995). Die daraus resultierende Freisetzung von Zellbestandteilen in den Extrazellulärraum führt zu einer Entzündungsreaktion (Bredesen 1995). Erst kürzlich konnte zudem eine weitere bedeutende Form des Zelltods, die Nekroptose, identifiziert werden (Detergeev et al. 2005). Diese auch als programmierte Nekrose bezeichnete Form des Zelltods wird ähnlich wie die Apoptose durch die Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet (Wu et al. 2012). Während einige maßgeblich am Nekroptose-Signalweg beteiligte Proteine wie die „receptor-interacting protein kinase 1“ (RIPK1) bereits identifiziert werden konnten, ist das komplizierte Zusammenspiel zwischen Apoptose, Nekrose und Nekroptose noch unvollständig verstanden (Feoktistova und Leverkus 2016).

### 1.2 Caspasen

Hauptverantwortlich für das Auslösen der zur Apoptose führenden intrazellulären Veränderungen ist eine Gruppe proteolytischer Enzyme, die als „cysteiny-l-aspartate-

specific-proteases“ (Caspasen) bezeichnet werden. Die Namensgebung dieser Enzymgruppe resultiert sowohl aus dem charakteristischen Cystein-Rest im aktiven Zentrum als auch aus der Eigenschaft, Substratproteine nach einem Aspartat-Rest zu spalten (Alnemri et al. 1996). Die Synthese der Caspasen erfolgt zunächst in Form inaktiver Vorstufen, sogenannter Zymogene (auch als Procaspasen bezeichnet) (Alnemri et al. 1996, McIlwain et al. 2013). Mittlerweile wurden insgesamt 14 Säugetiercaspasen identifiziert, darunter befinden sich 12 humane Caspasen (McIlwain et al. 2013). Weiterhin erfolgt eine Einteilung der Caspasen in zwei Hauptgruppen: inflammatorische sowie apoptotische Caspasen (Zimmermann et al. 2001). Zurückführen lässt sich die Gruppe der inflammatorischen Caspasen auf das Gen „Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“ (ICE), die Gruppe der apoptotischen Caspasen hingegen auf das Genprodukt „Caenorhabditis elegans death gene-3“ (CED-3), welches sich als essenziell für die Apoptose im Nematoden *Caenorhabditis elegans* erwies (Xue et al. 1996). Während die Inflammationscaspasen an der Regulation von Entzündungsvorgängen beteiligt sind, werden die an der Apoptose beteiligten Caspasen weiter in Initiator- (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, und -7) untergliedert.



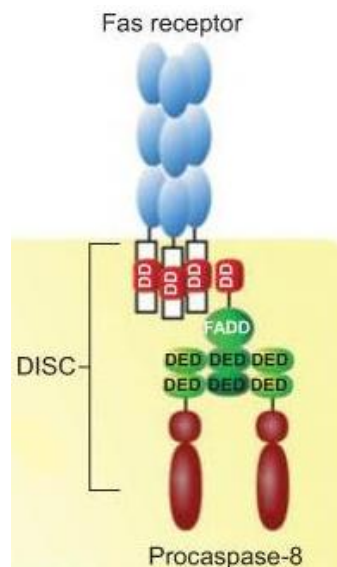
**Abbildung 1:** Darstellung der Caspase-Familie (aus McIlwain et al. 2013 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Caspasen werden entsprechend ihrer physiologischen Funktion in verschiedene Subfamilien untergliedert. Besonders hervorzuheben sind dabei die an der Apoptose beteiligten Initiator- und Effektorcaspasen. Während die Initiatorcaspasen im Verlauf des extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweges in Multienzymkomplexen aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der Effektorcaspasen mittels limitierter Proteolyse durch übergeordnete Initiatorcaspasen.

Der Aufbau der Caspasen selbst besteht aus drei Untereinheiten: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen, das aktive Zentrum enthaltenden und einer kleinen C-terminalen Untereinheit (Cohen 1997, Woolf und Green 1999, Zimmermann et al. 2001). Dabei variiert die Länge und Sequenz der Prodomäne zwischen Initiator- und Effektorcaspasen (Zimmermann et al. 2001). Initiatorcaspasen besitzen eine gegenüber den Effektorcaspasen längere Prodomäne, die spezielle Sequenzmotive enthält, durch die eine Interaktion mit Adaptermolekülen ermöglicht wird. Dabei handelt es sich im Fall von Caspase-2 und -9 um eine „caspase-recruitment domain“ (CARD) bzw. eine „death effector domain“ (DED) im Falle von Caspase-8 und -10 (Ashkenazi und Dixit 1998). Im Gegensatz dazu werden die mit einer kürzeren Prodomäne ausgestatteten Effektorcaspasen in der Regel mittels limitierter Proteolyse durch übergeordnete Initiatorcaspasen aktiviert. So aktivierte Effektorcaspasen lösen intrazellulär verschiedene Mechanismen aus, die schließlich zum Untergang der Zelle führen. Dazu zählt beispielsweise der Abbau von Strukturproteinen wie Lamin und Aktin oder die Aktivierung von DNasen, die am Abbau der DNA in 180 bp lange Fragmente (DNA-Leiter) beteiligt sind (Dhein et al. 1992, Martin und Green 1995, Schulze-Osthoff et al. 1998). Der Vorgang der Apoptose und die damit verbundene Aktivierung der Initiatorcaspasen kann sowohl über Ligandenbindung an zellmembranständige Rezeptoren (extrinsischer Signalweg) induziert werden als auch intrazellulären Ursprungs sein (intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg) (Zimmermann et al. 2001, Renault und Chipuk 2014).

### 1.3 Extrinsischer Apoptoseweg

Den Ausgangspunkt des extrinsischen Signalweges bildet die Aktivierung von plasmamembranständigen Transmembranrezeptoren durch ihre jeweiligen Liganden. Diese zur großen Gruppe der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie gehörigen Rezeptoren besitzen als gemeinsames Merkmal eine intrazellulär lokalisierte Todesdomäne (Schulze-Osthoff et al. 1998, Peter und Krammer 2003, Wajant 2003). Mittlerweile sind zahlreiche Mitglieder dieser auch als Todesrezeptoren bezeichneten Gruppe identifiziert: hierzu zählen der „tumor necrosis factor receptor 1“ (TNF-R1), CD95 (Apo-1, Fas), die „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) Rezeptoren DR 4 (TRAIL 1) und DR 5 (TRAIL 2), DR3, DR 6, der „ectodysplasine A receptor“ (EDA-R) sowie der „nerve growth factor receptor“ (NGF-R) (Aggarwal et al. 2012, Golks et al. 2005). Da der CD95-Rezeptor, synonym auch Fas-Rezeptor genannt, einer

der bislang am besten charakterisierten Rezeptoren ist, wird exemplarisch die Aktivierung des extrinsischen Signalweges anhand dieses Rezeptors dargestellt (Schulze-Osthoff et al. 1998, Scaffidi et al. 1999, Krueger et al. 2001a). Zunächst führt die Bindung des Liganden CD95L an Cystein-reiche, extrazellulär lokalisierte Domänen des Rezeptors zu einer konsekutiven Rezeptortrimerisierung (Daniel et al. 2001, MacEwan 2002). Der so aktivierte Rezeptor kann nunmehr mit zytosolischen Adaptermolekülen interagieren und das Todessignal intrazellulär weiterleiten. Dies erfolgt über eine als „death domain“ (DD) bezeichnete, ca. 80 Aminosäuren lange Sequenz mittels derer durch homologe Interaktionen das Adaptermolekül „Fas-associated death-domain-containing protein“ (FADD) rekrutiert wird (Schulze-Osthoff et al. 1998, Daniel et al. 2001, Budd et al. 2006). Dabei ist es wichtig, dass FADD neben der DD auch über eine DED zur Interaktion mit der N-terminal lokalisierten DED von Procaspase-8 bzw. -10 verfügt (Locksley et al. 2001, Golks et al. 2005, Strasser et al. 2009). Der so entstandene Komplex wird als „death-inducing-signaling-complex“ (DISC) bezeichnet und besteht aus dem membranständigen Rezeptor, dem Adaptermolekül FADD, zwei Isoformen von Procaspase-8 (Procaspase-8a und Procaspase-8b), Procaspase-10 und cFLIP (Fricker et al. 2010).



**Abbildung 2:** Aufbau des DISC (modifiziert nach Best 2008 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Der CD95 (Fas)-Rezeptor rekrutiert nach Aktivierung durch geeignete Liganden wie z.B. CD95L das Adaptermolekül FADD mittels homologer Interaktionen zwischen beiden „death domains“ (DD). FADD selbst verfügt neben einer DD über zwei „death effector domains“ (DED), mittels derer Procaspase-8 oder -10 Moleküle gebunden werden können.

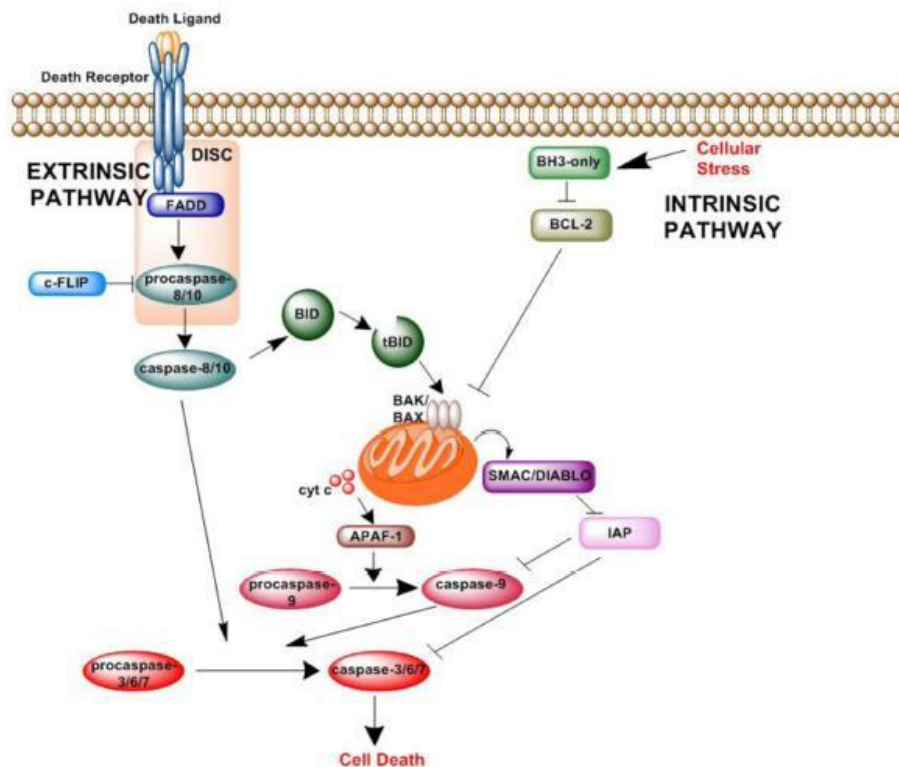
Durch die Bildung des DISC kommt es zu einer räumlichen Annäherung zweier benachbarter Procaspase-8 Moleküle (=Dimerisierung), die so durch das Prinzip der induzierten Nähe („induced proximity“) im Zuge eines zweistufig ablaufenden Prozesses autokatalytisch aktiviert werden (Schulze-Osthoff et al. 1998, Krueger et al. 2001a, Fricker et al. 2010). Am Ende dieses Aktivierungsweges steht ein heterotetrameres Caspase-8 Molekül, das sich aus zwei identischen Heterodimeren zusammensetzt, die wiederum jeweils aus einer großen (20 kDa) und einer kleinen (10 kDa) Untereinheit bestehen (Schulze-Osthoff et al. 1998, Wolf und Green 1999, Daniel et al. 2001). Die so prozessierte Form der Caspase-8 kann dann je nach Zelltyp und Menge von intrazellulär vorhandener Caspase-8 verschiedene Apoptose-Signalwege aktivieren (Scaffidi et al. 1999). In sogenannten Typ-II-Zellen führen kleine Mengen aktivierter Caspase-8 zur Spaltung des Proteins „BH3-interacting domain death agonist“ (Bid) (Scaffidi et al. 1999, Strasser et al. 2009). Das proapoptotische Protein Bid gehört zur „b-cell lymphoma-2“ (Bcl-2) Familie und führt am Mitochondrium in seiner aktivierten Form „truncated Bid“ (tBid) unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom C, wodurch ein mitochondrialer Apoptose-Signalweg in Gang gesetzt wird (Scaffidi et al. 1999, Zimmermann et al. 2001, Strasser et al. 2009). Dieser Mechanismus stellt somit eine Verknüpfung beider Signalwege dar (Strasser et al. 2009). In Typ-I-Zellen hingegen führen große Mengen von Caspase-8 zur bereits erwähnten direkten Aktivierung untergeordneter Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) mittels limitierter Proteolyse (Scaffidi et al. 1999, Wajant 2003, Neumann et al. 2010).

#### 1.4 Intrinsischer Apoptoseweg

Verschiedene Stimuli wie UV-Strahlung, DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren oder oxidativer Stress führen zur Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Signalweges (Parone et al. 2002). Dabei kommt es zur Freisetzung verschiedener, proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom C, „second mitochondria-derived activator of caspases/-direct IAP binding protein“ (Smac/Diablo), der Serinprotease Omi/HtrA2 (high-temperature requirement), Endonuklease G sowie den Procaspasen-2, -3, -8 und -9 aus dem Raum zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran (Zimmermann et al. 2001, Parone et al. 2002). Reguliert wird die Freisetzung dieser Moleküle durch Mitglieder der Bcl-2 Familie. Beispielsweise führen Mitglieder der Bcl-2 Familie zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch eben genannte



proapoptotische Moleküle ins Zytosol gelangen können (Chipuk und Green 2008). Eine wichtige Rolle spielt dabei der „apoptotic protease activating factor-1“ (Apaf-1): Durch die Bindung von (Desoxy-) Adenosintriphosphat ((d)ATP) im Zytosol kommt es zu einer Konformationsänderung von Apaf-1 (Hu et al. 1999, Parone et al. 2002). Dies ermöglicht es Apaf-1, zunächst Cytochrom C sowie anschließend Procaspase-9 zu binden (Parone et al. 2002). Dabei erfolgt die Bindung zwischen Apaf-1 und Procaspase-9 ähnlich wie die Bindung zwischen FADD und Procaspase-8 im extrinsischen Signalweg über homophile CARD-CARD Interaktionen (Zimmermann et al. 2001, Parone et al. 2002). Die beiden Rekrutierungsdomänen DED und CARD zeigen zwar nur eine geringe Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz, besitzen dafür aber eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur in Form von sechs antiparallelen  $\alpha$ -Helices (Hengartner 2000). Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass beide Domänen denselben Ursprung haben (Hofmann 1999). Der gebildete Komplex aus Apaf-1, (d)ATP, Cytochrom C und Procaspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet (Zou et al. 1999). Durch die entstandene räumliche Nähe mehrerer Procaspase-9-Moleküle kommt es auch hier zu einer autokatalytischen Aktivierung mit Generierung aktiver Caspase-9-Moleküle (Parone et al. 2002). Diese aktivieren nun ebenfalls die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, die in aktivierter Form zum Zelltod führen (Hu et al. 1999, Parone et al. 2002).



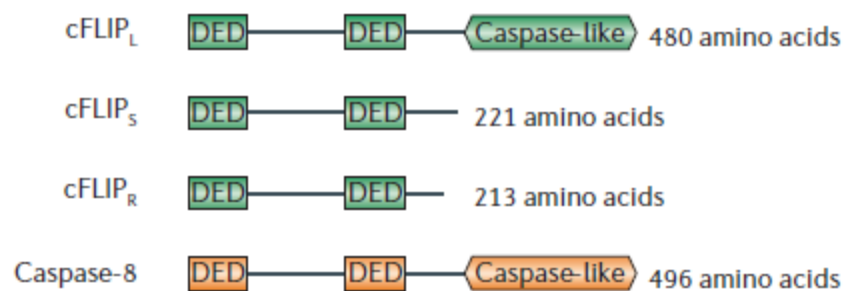
**Abbildung 3:** Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges (aus Zaman et al. 2014 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung entsprechender Liganden an den Todesrezeptor vermittelt. Die Ligandenbindung führt zu einer Aktivierung des Rezeptors mit Folge der Bildung eines als DISC bezeichneten Komplexes. Dieser Komplex führt zu einer Aktivierung von Procaspase-8 und -10. Die reifen Caspase-8 und -10 Moleküle können analog zu Caspase-9 die Effektorcaspasen aktivieren. Durch die Aktivierung des proapoptischen Moleküls Bid zu tBid, vermittelt durch Caspase-8, besteht eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg. Der intrinsische Signalweg wird hier exemplarisch durch zellulären Stress in Gang gesetzt. Dies führt zur Aktivierung von BH3-only Proteinen, die wiederum antiapoptische Proteine wie Bcl-2 hemmen. Vermittelt durch die Bax-homologen Protein Bax und Bak kommt es zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran, gefolgt von der Freisetzung von Cytochrom C sowie Smac/Diablo aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Cytochrom C bildet einen Komplex mit Procaspase-9 sowie Apaf-1, der als Apoptosom bezeichnet wird. Die so aktivierte Caspase-9 aktiviert nun die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, was schließlich den Zelltod bedingt.

## 1.5 Regulation der Apoptose

### 1.5.1 cFLIP-Proteine

Zu den wichtigsten Vertretern antiapoptischer Proteine zählt die Familie der „cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein“ (cFLIP)-Proteine. Ihre herausragende Rolle für Überleben oder Tod einer Zelle liegt begründet in ihrem essenziellen Einfluss nicht nur auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose, sondern auch auf die noch weitaus weniger erforschte Nekroptose (Tsuchiya et al.

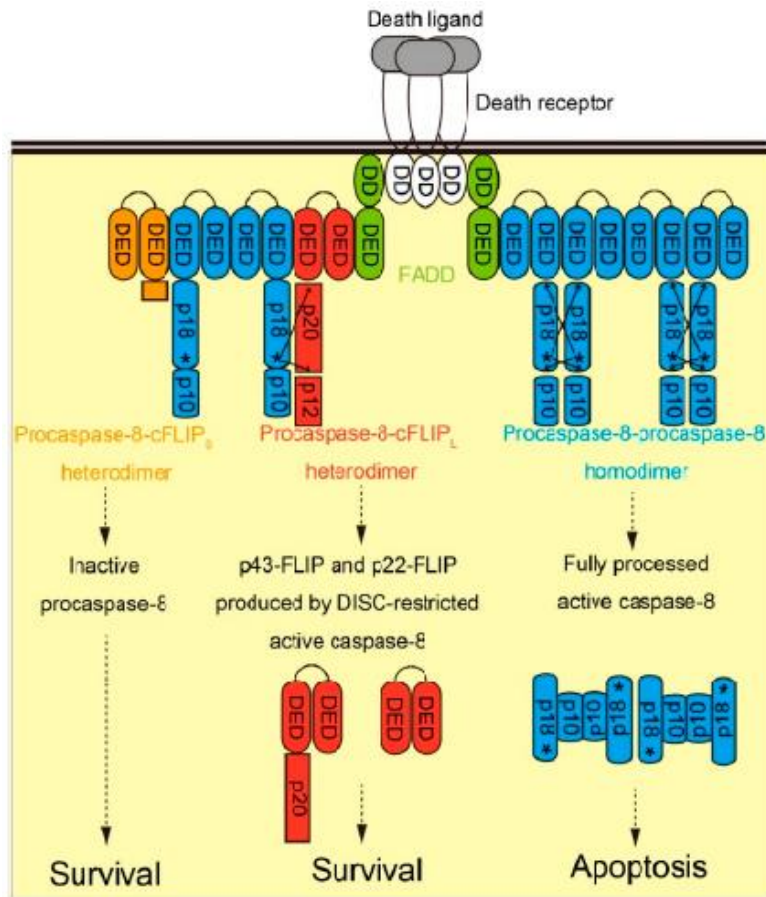
2016). Zunächst führte die Suche nach Proteinen, die eine DED-Domäne enthalten, zur Entdeckung des viralen Genproduktes vFLIP (Thome et al. 1997, Budd et al. 2006). Dieses erstmals in  $\gamma$ -Herpesviren entdeckte Protein verfügt über zwei DED-Domänen und ist Mitglied der DED-enhaltenden Proteinfamilie, zu der neben cFLIP auch FADD, Caspase-8, Caspase-10 und „phosphoprotein enriched in astrocytes 15“ (PEA 15) gehören (Budd et al. 2006). Das im Anschluss daran identifizierte humane Homolog wurde als cFLIP bezeichnet (Budd et al. 2006). Obwohl auf mRNA-Ebene bereits eine Vielzahl von cFLIP-Splicevarianten identifiziert wurden, gelang bisher auf Protein-Ebene nur der Nachweis von drei Isoformen (Budd et al. 2006, Golks et al. 2006, Fricker et al. 2010). Dazu zählt neben „cFLIP short“ (cFLIP<sub>S</sub>), das aus Raji-B-Zellen isolierte cFLIP<sub>R</sub> sowie „cFLIP long“ (cFLIP<sub>L</sub>) (Golks et al. 2005, Budd et al. 2006, Tsuchiya et al. 2016).



**Abbildung 4:** Darstellung der molekularen Struktur der cFLIP-Splicevarianten sowie von Caspase-8 (modifiziert nach Budd et al. 2006 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Alle cFLIP Vertreter enthalten analog zu Caspase-8 zwei DED-Domänen, während die Länge und Sequenz der C-terminalen Region variiert. cFLIP<sub>L</sub> verfügt im Gegensatz zu cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>R</sub> über eine C-terminal lokalisierte, enzymatisch inaktive Caspase-like Domäne.

Alle drei Vertreter verfügen wie Caspase-8 über zwei DED-Domänen (Budd et al. 2006). In Bezug auf den übrigen Aufbau weist cFLIP<sub>L</sub> große strukturelle Ähnlichkeiten zu Caspase-8 auf und enthält ebenfalls eine C-terminal lokalisierte Caspase-ähnliche Domäne (Krueger et al. 2001a, Strasser et al. 2009, Kavuri et al. 2011). Allerdings verfügt diese Domäne über kein katalytisch aktives Zentrum, so dass cFLIP<sub>L</sub> im Gegensatz zu Caspase-8 nicht selbst proteolytisch aktiv ist (Krueger et al. 2001a, Budd et al. 2006, Tsuchiya et al. 2016). Die kurze Form von cFLIP, cFLIP<sub>S</sub>, ähnelt in ihrem Aufbau hingegen vFLIP<sub>S</sub> und besitzt keine Caspase-ähnliche Domäne (Krueger et al. 2001a, Budd et al. 2006). Die dritte Isoform cFLIP<sub>R</sub> wurde bislang in verschiedenen Zelllinien wie Raji (B-Zell-Lymphom-Zelllinie), SKW 6.4 (humane B-Zell-Lymphoblasten-Zelllinie)

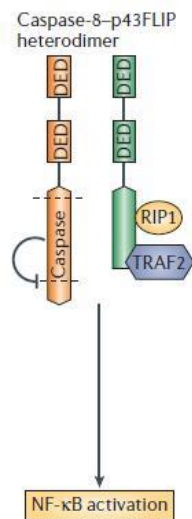
sowie humanen primären T-Zellen nachgewiesen (Golks et al. 2005, Tsuchiya et al. 2016). Sie unterscheidet sich strukturell lediglich durch den um 8 Aminosäuren kürzeren C-Terminus von cFLIP<sub>S</sub> (Golks et al. 2005). Golks et al. konnten zudem demonstrieren, dass cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>R</sub> ähnliche biochemische Eigenschaften in Hinblick auf Halbwertszeit und Rekrutierung zum CD95-DISC aufweisen (Golks et al. 2005). Durch die Ausstattung mit eben erwähnten DED-Domänen können cFLIP<sub>L</sub>, cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>R</sub> mit dem Adaptermolekül FADD (vgl. 1.3 *Extrinsischer Signalweg*) interagieren und so vor allem die über den CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose beeinflussen (Budd et al. 2006, Lavrik und Krammer 2012). Welche intrazellulären Effekte durch cFLIP vermittelt werden, hängt sowohl von der jeweiligen Isoform als auch von der intrazellulären cFLIP-Konzentration ab (Dickens et al. 2012). Die kurzen Isoformen cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>R</sub> können durch homophile Interaktionen mit FADD an den DISC rekrutiert werden und so die Todesrezeptor-medierte Apoptose durch Hemmung der Aktivierung von Caspase-8 unterbrechen (Fricker et al. 2010, Kavuri et al. 2011, Dickens et al. 2012). Die Funktion von cFLIP<sub>L</sub> hingegen gestaltet sich komplexer und ist abhängig vom intrazellulären Kontext. Niedrige physiologische intrazelluläre Konzentrationen von cFLIP<sub>L</sub> führen zu einer Heterodimerisierung von cFLIP<sub>L</sub> mit Procaspase-8 im DISC, wodurch die Aktivierung von Caspase-8 gefördert wird (Chang et al. 2002, Strasser et al. 2009, Dickens et al. 2012). In diesem Zusammenhang wirkt cFLIP<sub>L</sub> also proapoptotisch. Im Gegensatz dazu führen hohe Expressionslevel von cFLIP<sub>L</sub> zunächst zu einer allosterischen Aktivierung von Caspase-8. Allerdings wird durch die Anwesenheit von cFLIP<sub>L</sub> die in mehreren Teilschritten ablaufende Aktivierung von Caspase-8 nach Entstehung des Spaltproduktes p43/p10 unterbrochen. Dies hat zur Folge, dass Caspase-8 im DISC verankert bleibt und nur lokale Substrate spalten kann, was die apoptotische Signalkaskade blockiert (Dickens et al. 2012). Somit kann cFLIP<sub>L</sub> abhängig von der intrazellulären Konzentration sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirksam sein (Chang et al. 2002).



**Abbildung 5:** Funktionelle Rolle von cFLIP während der klassischen Rezeptor-vermittelten Apoptose (aus Tsuchiya et al. 2016 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Nach Stimulierung des Todesrezeptors durch einen entsprechenden Liganden kommt es zu einer Trimerisierung und Aktivierung des Rezeptors. Das Adapterprotein FADD bindet mittels DD-Interaktionen an den aktivierten Rezeptor. Infolgedessen wird durch Rekrutierung DED-Domänen enthaltender Proteine wie Procaspase-8, cFLIP<sub>L</sub>, cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>R</sub> der DISC gebildet. Die Homodimerisierung von Procaspase-8 führt zur Bildung einer voll funktionsfähigen, aktiven Caspase-8 und somit über die Aktivierung von Effektorcaspasen zur Apoptose. Die Heterodimerisierung von Procaspase-8 und cFLIP<sub>L</sub> hingegen führt nicht zur vollständigen Prozessierung von Caspase-8 sondern zur Entstehung der Spaltprodukte p43-FLIP und p22-FLIP und somit zum Überleben der Zelle. Die Heterodimerisierung von Procaspase-8 und cFLIP<sub>S</sub> inhibiert die Aktivierung von Procaspase-8 und verhindert ebenfalls die Apoptose der Zelle.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass cFLIP nicht nur maßgeblichen Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose ausübt, sondern darüber hinaus auch an der Regulation der Nekroptose beteiligt ist. Von entscheidender Bedeutung für diese alternative Form des Zelltods ist die Bildung eines als Ripoptosom bezeichneten Komplexes (Feoktistova et al. 2016). Die Hauptbestandteile dieses Komplexes bestehen aus RIPK1, FADD, Caspase-8 sowie cFLIP (Feoktistova et al. 2016, Feoktistova und Leverkus 2016, Tsuchiya et al. 2016). Analog zur Rezeptor-vermittelten Apoptose führt die Heterodimerisierung von Procaspase-8 und cFLIP<sub>L</sub> zur Entstehung von Spaltprodukten, die zwar in der Lage

sind, RIPK1 zu inaktivieren, aber nach Zerfall des Ripoptosoms selbst ihre Funktion verlieren (Tsuchiya et al. 2016). Im Gegensatz dazu führt die Heterodimerisierung mit cFLIP<sub>S</sub> zu einer nicht funktionsfähigen Form von Caspase-8, die somit nicht in der Lage ist, RIPK1 zu inaktivieren (Tsuchiya et al. 2016). In Folge dessen durchläuft die Zelle die auch als kontrollierte Nekrose bezeichnete Form des Zelltods. Zusätzlich zur Regulation von Rezeptor-vermittelter Apoptose sowie Nekroptose übt cFLIP auch noch weitere Funktionen aus. Dazu zählt beispielsweise die Aktivierung des „nuclear factor- $\kappa$ B“ (NF- $\kappa$ B) -Signalweges durch die cFLIP-Spaltprodukte p43-FLIP und p22-FLIP (Fricker et al. 2010, Neumann et al. 2010). Die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren reguliert die Expression von Genen, die entscheidend an Zelldifferenzierung, angeborener und adaptiver Immunabwehr sowie Apoptose beteiligt sind (Golks et al. 2006). p43-FLIP entsteht abhängig von der Stimulation des CD95-Rezeptors nach Spaltung durch Procaspase-8 im DISC und interagiert mit Komponenten des TNFR-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweges wie „tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor“ (TRAF)1, TRAF2 und „receptor-interacting protein 1“ (RIP1) (Neumann et al. 2010, Lavrik und Kramer 2012). Das Spaltprodukt p22-FLIP hingegen entsteht interessanterweise unabhängig von der Stimulation durch Todesrezeptoren im Zytosol und aktiviert den NF- $\kappa$ B-Signalweg durch direkte Bindung an den I $\kappa$ B Kinase Komplex (IKK) (Golks et al. 2006, Neumann et al. 2010, Lavrik und Kramer 2012).



**Abbildung 6:** NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch das cFLIP<sub>L</sub> Spaltprodukt p43-FLIP (modifiziert aus Budd et al. 2006 mit freundlicher Genehmigung des Verlags). p43-FLIP kann als Spaltprodukt von Caspase-8 mit RIP1 und TRAF2 interagieren und so den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren.

### 1.5.2 Die Rolle von cFLIP bei der Entstehung von Tumoren

Fehlfunktionen im Ablauf sowie der Regulation von Apoptose können das fragile Gleichgewicht von kontrolliertem Wachstum und Differenzierung von Geweben und Zellen empfindlich stören. Apoptoseresistenzmechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen (Ashwell et al. 1994). Dabei stellt der Schutz vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose einen von mehreren Mechanismen dar, der Tumorzellen nicht nur zu überleben hilft, sondern ihnen sogar eine Resistenz gegen Chemotherapeutika ermöglichen kann (Leverkus et al. 2008). Demnach können Moleküle, die die intrazelluläre Weiterleitung Todesrezeptor-vermittelter Signale hemmen, als Onkogene betrachtet werden (Leverkus et al. 2008). Zu dieser Gruppe gehören somit cFLIPs als auch cFLIP<sub>L</sub>, die, wie bereits erwähnt, rezeptornah die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und somit die Weiterleitung der Rezeptor-vermittelten apoptotischen Signalkaskade verhindern können (Shirley und Micheau 2010). Die These, dass cFLIP eine tragende Rolle bei der Entstehung von Tumoren zukommt, wird durch den Nachweis erhöhter intrazellulärer Konzentrationen von cFLIP in verschiedenen Tumoren untermauert (Shirley und Micheau 2010). Dies zeigte sich neben dem kolorektalen Karzinom auch in Melanomzelllinien sowie in Tumoren des Pankreas, der Ovarien und der Prostata (Griffith 1998, Elnemr et al. 2001, Hernandez et al. 2001, Xiao et al. 2003, Zhang et al. 2004). Somit stellt cFLIP auch einen wichtigen Ansatzpunkt für die Suche nach innovativen Tumorthérapien dar.

## 1.6 Fragestellung

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose stellt einen zentralen Baustein in der Pathogenese von Tumorerkrankungen dar. cFLIP ist ein bedeutender Regulator der Apoptose und eine verstärkte Expression kann somit hinweisend auf eine Fehlregulation der Apoptose bei der Entstehung und Progression von Tumoren sein. Bisher ist über die Expression von cFLIP in Hauttumoren nur wenig bekannt.

Zur Klärung der Frage inwieweit cFLIP in verschiedenen epithelialen und melanozytären Hauttumoren exprimiert wird, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Analyse der Spezifität der zu verwendenden cFLIP-Antikörper in der Immunhistochemie.
2. Analyse der cFLIP-Expression epithelialer kutaner Tumore (aktinische Keratose, Morbus Bowen, Keratoakanthom, Plattenepithelkarzinom inkl. dessen Metastasen, Basalzellkarzinom) anhand von paraffinierten Gewebeschnitten.
3. Untersuchung der cFLIP-Expression in melanozytären Tumoren (Nävus, unterschiedliche Melanomtypen und deren Metastasen) anhand von paraffinierten Gewebeschnitten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

AEC ImmPACT	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aqua Spüllösung	B. Braun, Melsungen
Aquatex Eindeckmittel	Merck, Darmstadt
Bis-Tris Protein Gel 10	Life Technologies, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> Lösung	PromoCell, Heidelberg
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
ECL	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EDTA Puffer pH 9	Dako, Hamburg
Eosin, gelblich	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Pyruvat	Pan Biotech, Aidenbach
NEA	Pan Biotech, Aidenbach
FCS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach

Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin-Pulver	Merck, Darmstadt
Hepes BSS	PromoCell, Heidelberg
Horse Serum Blocking Solution 2,5 %	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kalialaun	Merck, Darmstadt
KGM	PromoCell, Heidelberg
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Natriumiodat	Merck, Darmstadt
NuPAGE® Antioxidant	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Standard	Life Technologies, Darmstadt
Sekundärantikörper, biotinyliert	Dako, Hamburg
Signal Stain Diluent	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Streptavidin-Peroxidase	Dako, Hamburg
TNS	PromoCell, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Pan Biotech, Aidenbach
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
2.1.2 Geräte und Gebrauchsmaterial	
Autostainer XL ST 5010	Leica, Wetzlar

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dampfgarer „Multi Gourmet“	Braun, Kronberg
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eindeckautomat CV 5030	Leica, Wetzlar
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies, Carlsbad, USA
Glaspipetten	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Heraeus™ Megafuge	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Inkubationskammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Holland
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Lichtmikroskop DM IL	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Laborlux S	Leica, Wetzlar
Messbecher Glas 100 ml, 200 ml	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Mikrotom HM 355 S	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Neubauzählkammer	Labor Optik, Friedrichsdorf
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Paraffinstreckbad TFB 45	Medite, Burgdorf
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brand, Wertheim
Sicherheitswerkbank Nu 440	NuAire, Plymouth, USA
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad EH 4 basic	IKA, Staufen

Whatman® Papier	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
12 well chamber	ibidi, Planegg/ Martinsried

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### **Histologie:**

Eosinlösung	10 g Eosin
	Aqua dest ad 1000 ml

Hämalaun	1 g Hämatoxilin
	200 mg Kalilaun
	50 g Chloralhydrat
	1 g Zitronensäure
	1000 ml Aqua dest

PBS	140 mM NaCl
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### **Western Blot:**

2× SDS-Probenpuffer	4 % SDS
	10 % β-Mercaptoethanol
	20 % Glycerol

0,04 % Bromophenolblau  
in 0,125 M Trizma-HCl pH 6,8

TBS (pH 7,4)            25 mM Tris  
  
                              137 mM NaCl  
  
                              5 mM KCl  
  
                              7 mM CaCl<sub>2</sub>  
  
                              0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
  
                              0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

TBS-Tween-Puffer        10×TBS 100 ml  
  
                                  Tween 20 1 ml  
  
                                  Aqua dest ad 1000 ml

5× SDS-Laufpuffer        30,2 g Tris base  
  
                                  18,8 g Glycerin  
  
                                  50 ml 20 % SDS  
  
                                  Aqua dest ad 2000 ml

Transferpuffer            3,025 g Tris base  
  
                                  14,4 g Glycerin  
  
                                  200 ml Methanol

Aqua dest ad 1000 ml

Block-Lösung                      Magermilchpulver 5 % (w/v)

TBS-T ad 1000 ml

#### 2.1.4 Histologische Präparate

Das für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Gewebe stammt aus dem Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg. Insgesamt wurde dabei Material von ca. 240 Patienten untersucht, die sich dort im Zeitraum zwischen 2007 und 2014 in dermatologischer Behandlung befanden. Untersucht wurden verschiedene epitheliale (aktinische Keratose, Morbus Bowen, Keratoakanthom, Plattenepithelkarzinom inkl. Metastasen, Basalzellkarzinom) und melanozytäre (Nävus, unterschiedliche Melanomtypen, Metastasen) Tumoren der Haut. Die Tumordicke der untersuchten Präparate betrug mindestens 0,3 mm. Bei der Identifizierung der Gewebeproben wurden darauf geachtet, dass ein zu analysierender Hauttumor (und nicht mehrere) von je einem Patienten stammt, das galt auch für Metastasen. Nach Identifizierung wurden die Proben für die weitere Bearbeitung anonymisiert. Bezüglich der Durchführung an anonymisierten Hautproben bestehen seitens der Ethikkommission, Medizinische Fakultät der Universität Würzburg, keine ethischen Bedenken (Votum Az. 169/12).

#### 2.1.5 Zelllinien

Tumorzelllinie:

HaCaT:                      Humane Keratinozytenzelllinie

Primäre humane Keratinozyten:

Verwendet wurden käuflich erworbene, juvenile Keratinozyten der Firma promoCell, Heidelberg

#### 2.1.6 Antibiotika

Penicillin                      PAA Laboratories, Cölbe

Streptomycin PAA Laboratories, Cölbe

### 2.1.7 Zellkulturmedien

DMEM Medium	500 ml	DMEM
	5 ml	100× nicht essenzielle Aminosäuren
	5 ml	100 mM Natriumpyruvat
	7 ml	mM Glutamin
	1×10 <sup>5</sup> IE	Penicillin G
	1×10 <sup>5</sup> IE	Streptomycin
	5 %	FCS

KGM Medium	500 ml	KGM
	12, 3 ml	Supplement Mix
	105 µl	CaCl <sub>2</sub>
	1×10 <sup>5</sup> IE	Penicillin G
	1×10 <sup>5</sup> IE	Streptomycin

### 2.1.8 Antikörper

#### 2.1.8.1 Primärantikörper

In dieser Arbeit wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Antigen	Spezies	monoklonal/ polyklonal	Konzentration	Hersteller
cFLIP	Maus	monoklonal Klon G11	20 µg/ml (IHC) 2 µg/ml (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
cFLIP	Maus	monoklonal Klon NF6	2 µg/ml (WB)	Enzo Life Sciences, Lörrach
cFLIP	Kaninchen	monoklonal Klon EPR8438(2)	0,27 µg/ml (WB)	Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Antikörper.

### 2.1.8.2 Sekundärantikörper

Verwendet wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper der Firma Dako, Hamburg, der sowohl primäre Kaninchen- als auch Mausantikörper erkennt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Histologie

Bei den zu untersuchenden Proben handelt es sich um formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe. Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden aus den Paraffinblöcken 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Die so hergestellten Gewebeschnitte wurden je nach Verwendung auf verschiedene, beschriftete Objektträger aufgezogen. Während für die immunhistochemischen Färbungen „Super Frost Plus“ Objektträger der Größe 25×75×1 mm verwendet wurden, kamen für die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung herkömmliche Objektträger der Größe 26× 76 mm zum Einsatz. Anschließend wurden die Präparate über Nacht luftgetrocknet und bis zur Verwendung in Setzkästen aufbewahrt.

#### 2.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung zählt zu den am häufigsten angewandten Färbemethoden der Histologie. Mit vergleichsweise geringem Aufwand gelingt es, mithilfe dieser Standardfärbung einen ersten Überblick über das zu untersuchende Gewebe zu gewinnen. Zur Kernfärbung wird hierbei Hämatoxylin, ein zu den Flavinoiden gehörender Naturfarbstoff aus Blauholz verwendet, der Zellkerne blau-violett färbt. Die Zytoplasmafärbung erfolgt anschließend in Form einer Gegenfärbung mit dem Xanthenfarbstoff Eosin, wodurch unter anderem das Zytoplasma rot gefärbt wird.

Die maschinell durchgeführte Färbung erfolgte gemäß folgendem Protokoll: Entparaffinieren der Gewebeschnitte für 3×5 Minuten in Xylol und absteigender Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 %, 50 %) für je 2 Minuten, sowie 4×1 Minute Rehydrierung in Aqua dest. Im Anschluss wurde die Kernfärbung in Hämatoxylin für 4 Minuten durchgeführt, gefolgt vom sogenannten „Bläuen“ für 3×5 Minuten in Leitungswasser. Zuletzt erfolgte die Zytoplasmafärbung in Form einer Gegenfärbung für 3 Minuten in 1%igem Eosin. An einen weiteren Waschschrift schloss sich die aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 95 %, 100 %) für 2 Minuten sowie die erneute Inkubation in Xylol für 3×5 Minuten



an. Nach Eindecken der Paraffinschnitte konnten diese lichtmikroskopisch beurteilt werden.

#### 2.2.1.2 Immunhistochemie

Das Ziel der Immunhistochemie besteht darin, Antigene in Gewebeschnitten nachzuweisen. Dabei macht man sich die Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) zunutze. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper im Sinne eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Sichtbar gemacht wird diese Reaktion durch Koppelung eines Detektionssystems an den Antikörper, wodurch bereits kleine Mengen des Epitops verstärkt dargestellt werden können. Unterschieden wird dabei die direkte (Ein-Schritt-) von der indirekten (Zwei-Schritt-) Methode, wobei letztere Methode den Vorteil einer höheren Sensitivität sowie der größeren Auswahl an unkonjugierten Primärantikörpern bietet.

##### 2.2.1.2.1 LSAB-Methode

Die „Labeled-Strept-Avidin-Biotin“ (LSAB)-Methode zählt zu den indirekten Methoden und umfasst mehrere Einzelschritte. Zunächst wird das Gewebe mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert, der an das Antigen bindet. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe eines mit Biotin markierten Sekundärantikörpers. Dabei kommt es durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper zu einer Signalverstärkung. Im Anschluss werden die Gewebeprobe mit Avidin oder Streptavidin inkubiert. Während es sich bei Avidin um ein aus Hühnereiweiß hergestelltes Glykoprotein handelt, ist Streptavidin ein Protein bakteriellen Ursprungs. Beide besitzen vier identische Untereinheiten, wovon jede Untereinheit ein Molekül Biotin binden kann. Bedingt durch die starke Affinität von (Strept-) Avidin gegenüber Biotin erfolgt die Verknüpfung zwischen biotinyliertem Sekundärantikörper und (Strept-) Avidin Peroxidase. Avidin und Streptavidin selbst können beispielsweise mit Enzymen oder Fluorochromen markiert werden. Ein sehr gebräuchliches Enzym ist die Meerrettich-Peroxidase, die Chromogene wie Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) oder Amino-Ethyl-Carbazol (AEC) in farbige Endprodukte überführen kann.

##### 2.2.1.2.2 Primärantikörper

Für die Darstellung von cFLIP<sub>SL</sub> in humanem Gewebe wurde nach Austestung aller drei genannten Primärantikörper (vgl. 2.1.8.1 *Primärantikörper* sowie 3.1.2 *Immunhistochemie*) der monoklonale, aus der Maus stammender Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, verwendet. Dieser richtet sich gegen die Aminosäuren 1 bis 202 von FLIP humanen Ursprungs. Die Verdünnung des verwendeten Antikörpers betrug 1:10 (ca. 20 µg/ml) in 1 % „normal horse serum“ (NHS).

#### 2.2.1.2.3 Optimierung des Färbeprotokolls

Um ein bestmögliches Ergebnis zu erreichen, wurden folgende Variablen optimiert: Kochzeit zur Antigendemaskierung, Konzentration des Primärantikörpers und Färbemethode. Das beste Färbeergebnis zeigte sich nach mehreren Probefärbungen bei einer Kochzeit von 20 Minuten in EDTA-Puffer (pH 9), eine Verdünnung des Primärantikörpers in einer Konzentration von 1:10 (entspricht einer finalen Konzentration von 20 µg/ml) sowie der Anwendung der bereits beschriebenen LSAB-Methode. Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte in 1 % NHS.

#### 2.2.1.2.4 Färbeprotokoll cFLIP

Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurden die Gewebeschnitte jeweils 3×5 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 %, 50 %) für je 2 Minuten, sowie 4×1 Minute in Aqua dest. rehydriert. Zur Vermeidung des Austrocknens der Schnitte wurden alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer vorgenommen. Um eine Demaskierung des zu untersuchenden Antigens zu erreichen, wurden die Präparate für 20 Minuten in EDTA-Puffer (pH 9) im Dampfgarer gekocht. Nach 20-minütigem Abkühlen erfolgte ein Waschvorgang von 2×5 Minuten in PBS. Zur Verringerung von Hintergrundfärbungen erfolgte sowohl ein Blocken unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers mittels „normal horse serum blocking solution“ (2,5 %) (Inkubationszeit 30 Minuten, anschließend Waschvorgang 2×5 Minuten PBS) als auch der endogenen Peroxidase mittels Peroxidase-Blocking Solution (Inkubationszeit 30 Minuten, anschließend Waschvorgang 2×5 Minuten PBS). Erst danach folgten die Färbeschritte nach der bereits vorgestellten LSAB-Methode, die folgende Einzelschritte umfasst:

1. Primärantikörper
2. biotinylierter Sekundärantikörper
3. LSA-Konjugat
4. Chromogen
5. Gegenfärbung

Dabei wurden folgende Inkubationszeiten gewählt: Inkubation des Primärantikörpers über Nacht (14 h), 30 Minuten Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, 30 Minuten Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex, sowie 30 Minuten Inkubation mit dem hier verwendeten Chromogen AEC (angesetzt gemäß den Angaben des Herstellers Vector Laboratories). AEC wird durch die Enzymaktivität der Peroxidase in ein rötliches Endprodukt überführt. Die verwendete Menge an Substanz betrug pro Schnitt jeweils 100 µl. Außerdem wurde zwischen jedem Färbeschritt ein Waschvorgang von 2×5 Minuten in PBS durchgeführt.

Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 7 Sekunden, gefolgt von 5-minütigem „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser. Eingedeckt wurden die Gewebeschnitte mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex.

#### 2.2.1.2.5 Kontrollen

##### 2.2.1.2.5.1 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle bezeichnet man einen Gewebeschnitt, der das gesuchte Antigen sicher enthält. Zu diesem Zweck wurde hier ein Schnittpräparat eines humanen Plattenepithelkarzinoms der Haut mit bekannter Positivität verwendet. Dieses Präparat wurde zur Qualitätskontrolle bei jedem Färbedurchlauf auf einem gesonderten Objektträger mitgeführt.

##### 2.2.1.2.5.2 Negativkontrolle

Negativkontrollen dienen zur Aufdeckung unspezifischer Reaktionen. Die gebräuchlichere und hier eingesetzte Methode ist das Austauschen des Primärantikörpers durch Normalserum (Serum derselben Spezies vor der Immunisierung) in einem zusätzlich mitgeführten Gewebeschnitt. Zum Einsatz kam Maus-IgG in derselben Konzentration

des Primärantikörpers, ebenfalls gefolgt vom regulären Färbeprotokoll. Dabei zeigten sich konsistent negative Ergebnisse.

#### 2.2.1.2.6 Histologische Auswertung

Um die Qualität der Färbung zu gewährleisten, erfolgte vor Beginn der eigentlichen Auswertung zunächst die Überprüfung der bei jedem Färbedurchgang mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle. Erst danach wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate von zwei Bewertern unabhängig voneinander sowie ohne Kenntnis des vorgelegten Materials lichtmikroskopisch ausgewertet. Dazu wurde zunächst bei 25-facher Vergrößerung der repräsentative Ausschnitt des Tumors aufgesucht und bei 100-facher Vergrößerung analysiert. Zur erweiterten Beurteilung der Präparate wurden in Einzelfällen auch die H.E.-gefärbten Standardschnitte hinzugezogen. Die Gewebeschnitte wurden entsprechend dem prozentualen Anteil gefärbter Zellen sowie der Intensität der Färbereaktion bewertet. Für die Intensität der Färbereaktion wurde folgender Score herangezogen: 0 für keine, 1 für schwache, 2 für mäßige und 3 für starke Anfärbung. Um einer möglichen Variabilität der Färbeintensität in den einzelnen Durchgängen gerecht zu werden, wurde diese immer im Verhältnis zur Intensität der Positivkontrolle beurteilt. Es wurden nur diejenigen Präparate als positiv gewertet, deren Anteil positiver Zellen  $\geq 30\%$  betrug und deren Färbeintensität mindestens mäßig war.

#### 2.2.2 Zellkultur

##### 2.2.2.1 Kultivieren und Passagieren der Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Außerdem wurden alle Arbeitsschritte mit Zelllinien unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

##### Tumorzelllinie HaCaT

Für die adhärent wachsende Zelllinie HaCaT wurde als Zellkulturmedium DMEM verwendet. Vor Verwendung wurde das Kulturmedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Um optimale Wachstumsbedingungen garantieren zu können, mussten die Zellen nach Erreichen einer gewissen Zelldichte geteilt werden. Der Zeitpunkt wurde dabei in Abhängigkeit von den spezifischen

Eigenschaften der Zellen gewählt, adhären wachsende Zellen sollten ungefähr bei einer Konfluenz von 70-80 % passagiert werden. Dazu wurden zunächst alle benötigten Reagenzien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Im Anschluss musste das alte Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen werden. Danach wurde der Monolayer mit 5 ml EDTA überschichtet, dieses wurde nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten im Brutschrank wieder abgesaugt. Um den Zellrasen enzymatisch von seiner Unterlage zu lösen, erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung. Diese wurde ebenfalls vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, da diese Temperatur dem Aktivitätsoptimum von Trypsin entspricht. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5-minütiger Inkubation durch die Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt. Nach Zentrifugation bei  $250 \times g$  für 5 Minuten und einer Temperatur von 4 °C sowie Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in ein definiertes Volumen neuen Mediums überführt und auf neue Kulturflaschen verteilt.

#### Humane primäre Keratinozyten

Als Kulturmedium wurde für die Keratinozyten „Keratinocyte Growth Medium“ (KGM) verwendet, welches vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt und alle 2-3 Tage erneuert wurde. Bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Dazu wurden das Kulturmedium sowie alle Komponenten des verwendeten Detach Kits (enthält HEPES BSS, Trypsin/EDTA Lösung sowie TNS Lösung) der Firma PromoCell im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach Absaugen des Überstandes des alten Mediums sowie Waschen der Zellen in BSS erfolgte die Zugabe von 10 ml der Trypsin/EDTA-Lösung. Die enzymatische Ablösung der adhären wachsenden Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 10-15 Minuten bei Raumtemperatur durch die Zugabe von TNS beendet. Die so vorbehandelten Zellen wurden in ein Falcontube überführt und für 3 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und zur Weiteranzucht auf Zellkulturflaschen verteilt.

#### 2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauzählkammer. Dazu wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 20 µl einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung gemischt. Der Farbstoff Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen und erlaubte somit eine Differenzierung zwischen toten, blau gefärbten und lebenden, ungefärbten

Zellen. Um die Zellen auszählen zu können, wurde zunächst das Zählnetz der Kammer mit der gefärbten Zellsuspension befüllt. Danach konnten unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung vier Großquadrate ausgezählt werden. Zur Berechnung der Zelldichte (Zellen/ml) muss der Mittelwert der Zellzahl in den einzelnen Großquadraten mit dem Verdünnungsfaktor 2 (1:2 Verdünnung mit der Trypanblau-Lösung) und dem Volumenfaktor  $10^4$  multipliziert werden.

#### 2.2.2.3 Auftauen der Zelllinien

##### Tumorzelllinie HaCaT

Um die in flüssigem Stickstoff konservierten Zellen aufzutauen, wurde zunächst das entsprechende Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden dann durch Zugabe des vorgewärmten Mediums sowie zügiges Auf- und Abpipetieren aufgetaut. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten bei  $250 \times g$ . Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium für die weitere Kultivierung resuspendiert.

##### Humane primäre Keratinozyten

Für das Auftauen der Keratinozyten wurde eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 30 ml Medium befüllt und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorequibriert. Danach wurden die aufzutauenden Zellen für ca. 90 Sekunden im Wasserbad erwärmt und nach Zentrifugation (analog zu den Tumorzelllinien) in die bereits vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

#### 2.2.2.4 Einfrieren der Zelllinien

##### Tumorzelllinie HaCaT

Das verwendete Einfriermedium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 40 % Kulturmedium (DMEM), 50 % FCS sowie 10 % DMSO. Da das verwendete Gefrierschutzmittel DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch ist, wurde darauf geachtet, mit vorgekühltem Gefriermedium zu arbeiten. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurden die einzufrierenden Zellpellets vorsichtig im Gefriermedium resuspendiert. Die so befüllten und vorher beschrifteten Kryoröhrchen wurden zunächst für

24 Stunden bei -80 °C gekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### Primäre humane Keratinozyten

Das Einfrieren der Keratinozyten erfolgte weitestgehend analog zu den Tumorzelllinien. Als Einfriermedium wurde ein Medium der Firma PromoCell verwendet. Nach enzymatischem Ablösen der adhären wachsenden Zellen, Zentrifugation und Einstellen der Zellzahl pro Kryoröhrchen auf  $5 \times 10^5$ /ml erfolgte auch hier nach 24-stündiger Kühlung bei -80 °C die Überführung der zu lagernden Zellen in flüssigen Stickstoff.

#### 2.2.2.5 Kultur der Zellen auf gekammerten Objektträgern

In der vorliegenden Arbeit wurden sterile Objektträger der Firma ibidi im 12-well Format verwendet. Zur Vorbereitung wurden diese zunächst bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 100 µl 0,01%igem Poly-L-Lysine (PLL) pro well beschichtet. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Objektträger unter der Sterilbank offen getrocknet. Im Anschluss wurden pro well jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen gelöst in 100 µl PBS pipettiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Objektträger bei  $250 \times g$  für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C, gefolgt von vorsichtigem Absaugen des PBS-Überstandes. Zur Fixierung der Zellen wurden die Objektträger 30 Minuten lang mit 3,5%igem Formalin inkubiert. Nach Absaugen des Formalinüberstandes wurden die Objektträger schließlich 30 Minuten lang offen unter dem Abzug getrocknet. Die so hergestellten Objektträger wurden im Anschluss demselben immunhistochemischen Färbeprotokoll unterzogen wie das formalinfixierte, paraffineingebette Gewebe (vgl. 2.2.1.2.4 Färbeprotokoll *cFLIP*).

#### 2.2.3 Western Blot

Die Methode des Western Blots dient dazu, einzelne Proteine innerhalb eines Proteingemisches zu identifizieren und umfasst folgende Einzelschritte: Nach Vorbereitung der zu verwendenden Proben wird das Proteingemisch zunächst mittels einer SDS-Gelelektrophorese entsprechend Größe und elektrischer Ladung in Proteinbanden aufgetrennt. Im nächsten Schritt erfolgt dann das eigentliche „Blotten“. Darunter versteht man den Transfer der zuvor aufgetrennten Proteine auf eine (Nitrocellulose-) Membran.

Anschließend können die zu untersuchenden Antigene mittels immunhistochemischer Färbemethoden detektiert werden.

#### 2.2.3.1 Herstellung der Zelllysate

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen zunächst entsprechend Punkt 2.2.2.2 *Kultivieren und Passagieren der Zelllinien* vorbehandelt und bei ca. 70-80 % Konfluenz in den Versuch eingesetzt. Hierfür wurden die mit Hilfe der EDTA/Trypsin-Lösung enzymatisch abgelösten Zellen in PBS gewaschen, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Zur Vorbereitung auf die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l 2 $\times$ -SDS Probenpuffer (Laemmli Puffer) resuspendiert und 5 Minuten lang bei 95 °C gekocht. Nach kurzem Kühlen auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei  $250 \times g$ . Das so gewonnene Zelllysate wurde entweder sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Dabei durchlaufen die aufzutrennenden Proteine zunächst ein niedrig prozentiges Sammelgel, um anschließend in einem höher prozentigen Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt zu werden. Im vorliegenden Versuch wurde hierzu ein vorgefertigtes Polyacrylamidgel (4-12 % Bis-Tris Protein Gel) mit 10 Kammern verwendet. Nach Spülen der Taschen wurden diese mit jeweils 15  $\mu$ l der vorbereiteten Proben befüllt, zusätzlich wurde eine Kammer mit 10  $\mu$ l Proteinstandard geladen. Durch das Mitführen eines Proteinstandards konnten die Western Blot-Banden den entsprechenden Molekulargewichten zugeordnet werden. Das so vorbereitete Gel wurde anschließend in die mit Laufpuffer (25 ml 20 $\times$  MES, 475 ml dH<sub>2</sub>O) befüllte Elektrophoresekammer eingebracht und zur Auftrennung der Proteine eine Spannung von 90 V angelegt. Nach 10 Minuten erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf konstant 130 V für ca. 90 Minuten. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die SDS- Gelelektrophorese gestoppt.

#### 2.2.3.3 Membrantransfer

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Membran. Dazu wurde zunächst das auf die richtige Größe zugeschnittene Polyac-



rylamid-Gel auf eine mit Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Umgeben von ebenfalls in Transferpuffer getränktem Filterpapier wurde der Membran-/Gelkomplex unter Vermeidung von Luftblasen in die Blotkammer eingespannt. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt und für 60 Minuten eine Spannung von konstant 30 V angelegt, um die Proteine auf die Membran zu transferieren. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte mittels einer Färbung mit Ponceau S-Lösung. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten 10 Minuten in der Ponceau S-Lösung geschwenkt, danach mit H<sub>2</sub>O entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Nach fotografischer Dokumentation des Ergebnisses wurde die Membran 1 × 5 Minuten in TBS-Tween entfärbt und gewaschen. Die Blots wurden entweder direkt weiterverwendet oder bis zum Gebrauch auf Whatman-Papier getrocknet und gelagert.

#### 2.2.3.4 Antikörperdetektion

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte zunächst das Blocken der Membran mit 5 % Magermilch/TBS-Tween für 60 Minuten. Anschließend wurde die Membran unter ständigem Schütteln 3 × 5 Minuten in TBS-Tween gewaschen und danach über Nacht unter ebenfalls ständigem Schwenken mit dem in Magermilch verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Dabei wurde der monoklonale Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (Klon G11) in einer Verdünnung von 1:10 (entspricht 2 µg/ml), der Antikörper der Firma Enzo Life Sciences (Klon NF6) in einer Verdünnung von 1:500 (entspricht 2 µg/ml) und der Antikörper der Firma Abcam (Klon EPR8438(2)) in einer Verdünnung von 1:1000 (entspricht 0,27 µg/ml) in 5 % Magermilchpulver verwendet. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Primärantikörper durch erneutes Waschen in TBS-Tween entfernt und der jeweilige Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper (anti-rabbit, anti-mouse) im Verhältnis 1:2000 in 5 % Magermilch verdünnt aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einem erneuten Waschschrift erfolgte schließlich die Immunodetektion der nachzuweisenden Proteine unter Anwendung eines „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-Kits gemäß den Herstellerangaben. Direkt im Anschluss erfolgte die Belichtung der Röntgenfilme mit anschließender Entwicklung.

### 3 Ergebnisse

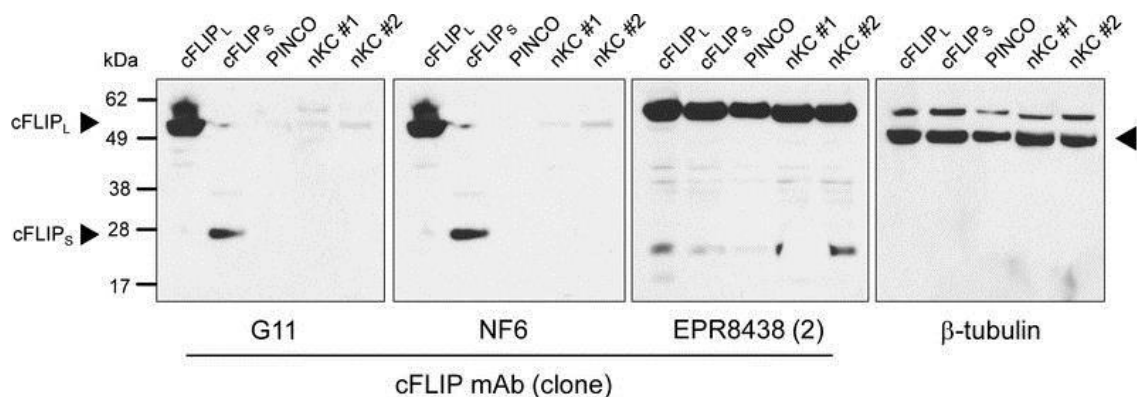
In bisherigen Arbeiten erfolgte üblicherweise der Nachweis von cFLIP mittels Western Blot Analysen (Irmeler et al. 1997, Griffith et al. 1998, Scaffidi et al. 1999, Kamarajan et al. 2003, Leverkus et al. 2003). Daher war ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit, zunächst die Spezifität von käuflich erworbenen cFLIP-Antikörpern bei der Verwendung von formalinfixierten und paraffinierten Gewebeproben zu bestimmen. Hierzu wurden etablierte cFLIP-überexprimierende HaCaT-Keratinocyten (Diessenbacher et al. 2008, Armbruster et al. 2009) verwendet, mit denen zum einen Western Blot-Analysen, zum anderen die Detektionseigenschaften nach Formalinfixierung der Zelllinien *in situ*, d.h. auf einem Objektträger, bestimmt wurden.

#### 3.1 Spezifität des verwendeten Antikörpers

##### 3.1.1 Western Blot

Für die späteren immunhistochemischen cFLIP-Analysen wurden zwei monoklonale Maus-Antikörper verschiedener Hersteller sowie ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper ausgewählt. Vorausgegangene Publikationen belegen die Eignung des monoklonalen Maus-Antikörpers Klon G11 für die Detektion von cFLIP im Western Blot (Mathas et al. 2004, Braun et al. 2015). Braun et al. konnten zudem zeigen, dass der Antikörper sowohl cFLIP<sub>L</sub> als auch cFLIP<sub>S</sub> nachweist (Braun et al. 2015). Auch der zweite verwendete monoklonale Maus-Antikörper Klon NF6 fand bereits mehrfach in Western Blot Analysen Anwendung und weist ebenfalls beide Splicevarianten nach (Scaffidi et al. 1999, Leverkus et al. 2003, Wachter et al. 2004, Geserick et al. 2008, Kavuri et al. 2011). Dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper Klon EPR8438(2) wurde von Herstellerseite eine hohe Spezifität attestiert, allerdings wurden bislang für diesen Antikörper noch keine Daten hinsichtlich der Detektion von cFLIP im Western Blot veröffentlicht. Für die Analyse der verschiedenen cFLIP-Antikörper wurden die Proteinextrakte folgender Zelllinien elektrophoretisch aufgetrennt: cFLIP<sub>L</sub>-, cFLIP<sub>S</sub>- und den Leervektor PINCO überexprimierende HaCaT-Keratinocyten sowie zwei unabhängige Chargen primärer humaner Keratinocyten (nKC#1 und nKC#2). Wie in Abbildung 7 ersichtlich, zeigte sich bei den cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden HaCaT-Keratinocyten unter Verwendung der beiden monoklonalen Maus-Antikörper (G11, NF6) eine spezifische, singuläre Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Hingegen zeigte sich bei

Verwendung des monoklonalen Kaninchen-Antikörpers eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 59 kDa. In Analogie zu publizierten Daten detektierten die beiden monoklonalen Maus-Antikörper spezifisch cFLIP<sub>s</sub> mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Diese cFLIP-Isoform wurde von dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper nicht erkannt. Konsistent fand sich unter Verwendung der Leervektor-tragenden HaCaTs (PINCO) ein negatives Ergebnis für cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>s</sub> bei Gebrauch der beiden monoklonalen Maus-Antikörper, wohingegen sich auch hier für den monoklonalen Kaninchen-Antikörper ein Signal bei 59 kDa ergab. Bei beiden Chargen primärer humaner Keratinozyten (nKC#1 und nKC#2) zeichnete sich unter Verwendung der monoklonalen Maus-Antikörper eine Bande bei 55 kDa ab. Die im Vergleich zu den Leervektor-tragenden HaCaT-Zellen (PINCO) verstärkte Intensität der Bande ist dadurch bedingt, dass primäre Keratinozyten üblicherweise eine höhere Konzentration an cFLIP aufweisen (Dissenbacher et al. 2008). Konträr zu diesem Ergebnis zeigt sich unter Verwendung des monoklonalen Kaninchen-Antikörpers bei den nKCs eine nicht näher spezifizierbare Bande bei 59 kDa. Zudem ist die Intensität der Banden nahezu identisch mit den Banden der übrigen untersuchten Zelllinien. Als interne Ladekontrolle wurde das „house-keeping-gene“  $\beta$ -Tubulin (50 kDa) mitgeführt, dass mit geringer Abweichung bei den PINCO-Zellen die gleichmäßige Beladung an Proteinextrakt pro aufgetrennter Spur belegt.

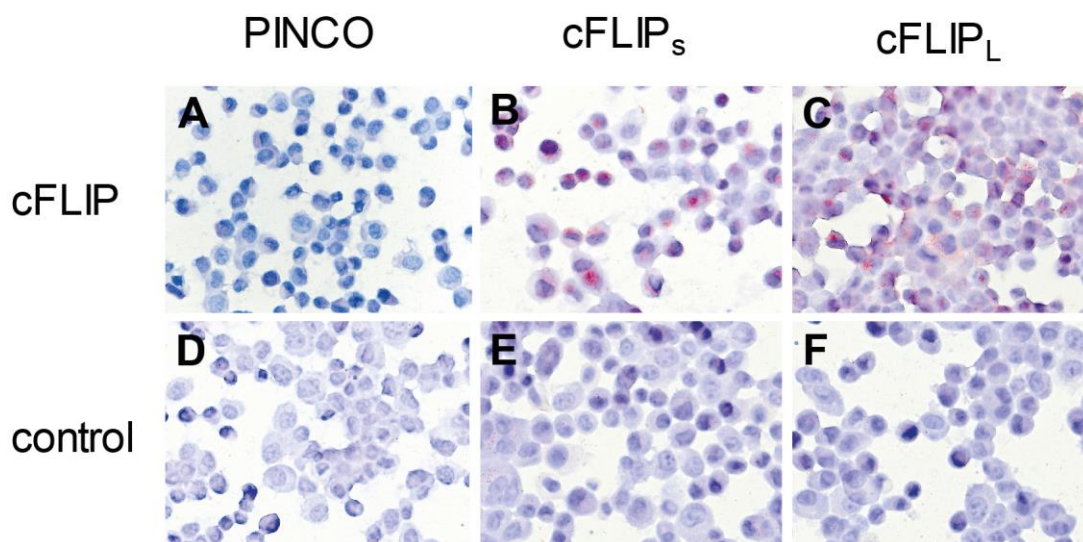


**Abbildung 7:** Western Blot Analyse der monoklonalen Antikörper Klon G11, Klon NF6 sowie EPR8438(2). Untersucht wurden jeweils cFLIP<sub>L</sub>-, cFLIP<sub>s</sub>- und den Leervektor PINCO-überexprimierende HaCaT-Zellen sowie zwei unterschiedliche Chargen primärer humaner Keratinozyten (nKC#1 und nKC#2). Unter Verwendung von Klon EPR8438 (2) zeigte sich eine unspezifische Bande, wohingegen Klon G11 und NF6 die Isoformen cFLIP-long (cFLIP<sub>L</sub>) und cFLIP-short (cFLIP<sub>s</sub>) spezifisch detektieren. Das „house-keeping-gene“  $\beta$ -Tubulin diente als interne Ladekontrolle.

Unter Berücksichtigung des Ergebnisses der Western-Blot Analyse lassen sich somit folgende Schlussfolgerungen treffen: wie bereits in vorausgegangenen Publikationen beschrieben, detektieren die untersuchten monoklonalen Maus-Antikörper G11 und NF6 spezifisch beide Isoformen von cFLIP. Im Gegensatz dazu ist der monoklonale Kaninchen-Antikörper EPR8438(2) nicht geeignet für die Analyse von cFLIP.

### 3.1.2 Immunhistochemie

Im weiteren Verlauf wurde die Eignung der Antikörper NF6 und G11 für immunhistochemische Analysen überprüft. Hierbei ergaben sich über das dargelegte Protokoll (vgl. 2.2.1.2.4 Färbeprotokoll cFLIP) konsistent positive Befunde unter Verwendung des Klons G11. Daher werden im Weiteren die Ergebnisse unter Verwendung dieses Klons dargestellt. Um die Immunhistochemie möglichst realitätsgetreu mit einer Positivkontrolle durchzuführen, wurden o.g. Zelllinien auf speziellen Objektträgern kultiviert und schließlich *in situ* mit Formalin fixiert. Die immunhistochemische Analyse ergab, dass Klon G11 zuverlässig cFLIPs und cFLIP<sub>L</sub> in entsprechend überexprimierenden HaCaT-Zellen detektiert (siehe Abb. 8). Als Negativkontrolle diente Serum derselben Spezies vor der Immunisierung, in diesem Fall also Maus-IgG.



**Abbildung 8:** Immunhistochemie cFLIP-überexprimierender HaCaT-Zellen. cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>s</sub> werden durch den monoklonalen Maus-Antikörper G11 detektiert (B, C). Den Leervektor PINCO tragende HaCaT-Zellen (A) sowie Serum derselben Spezies vor Immunisierung (D-F) dienten als Negativkontrolle (400-fache Vergrößerung).

Zusammenfassend decken sich die immunhistochemischen Ergebnisse mit denen der Western Blot-Analyse, was belegt, dass der Klon G11 spezifisch die beiden Splicevarianten cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> nachweist.

### 3.2 cFLIP-Expression kutaner Tumoren

In den vergangenen Jahrzehnten ist eine deutliche Zunahme der Inzidenz von Hauttumoren zu verzeichnen (Leiter und Garbe 2008, Tarallo et al. 2008, Gurney und Newlands 2014). Die Gründe dafür sind vielfältig. Neben veränderten Freizeitaktivitäten, Änderungen des Bekleidungsstils, einer verlängerten Lebenserwartung und der Ozondepletion spielen auch genetische Faktoren sowie eine längerfristige (in der Regel iatrogene) Immunsuppression eine entscheidende Rolle (Leiter und Garbe 2008). Sicherlich ist auch die Einführung von Hautscreening-Programmen in einigen Ländern mitverantwortlich für die steigende Zahl von Neuerkrankungen (Lomas et al. 2012).

Um der Frage nachzugehen, inwieweit möglicherweise das anti-apoptotische Molekül cFLIP zu einer Apoptoseresistenz kutaner Hauttumore beiträgt, erfolgten immunhistochemische Analysen epithelialer und melanozytärer Tumoren.

#### 3.2.1 Epitheliale Tumoren

Bislang konnten bereits in einigen epithelialen Tumoren erhöhte Mengen cFLIP nachgewiesen werden (Shirley und Micheau 2010). Dazu zählen neben dem Kolonkarzinom auch Malignome des Pankreas und der Harnblase sowie das Adenokarzinom der Lunge (Elnemr et al. 2001, Hernandez et al. 2001, Korkolopoulou et al. 2004, Salon et al. 2006). Weitaus weniger bekannt ist bisher über die Expression von cFLIP in epithelialen kutanen Tumoren der Haut. Daher erfolgte in der folgenden Arbeit die Analyse verschiedener epithelialer Tumoren hinsichtlich der Expression von cFLIP. Untersucht wurden jeweils 20 Präparate folgender Tumorentitäten: Basalzellkarzinom (BCC), aktinische Keratose (AK), Morbus Bowen (MB), Keratoakanthom (KA), Plattenepithelkarzinom (PEC) sowie Metastasen des Plattenepithelkarzinoms.

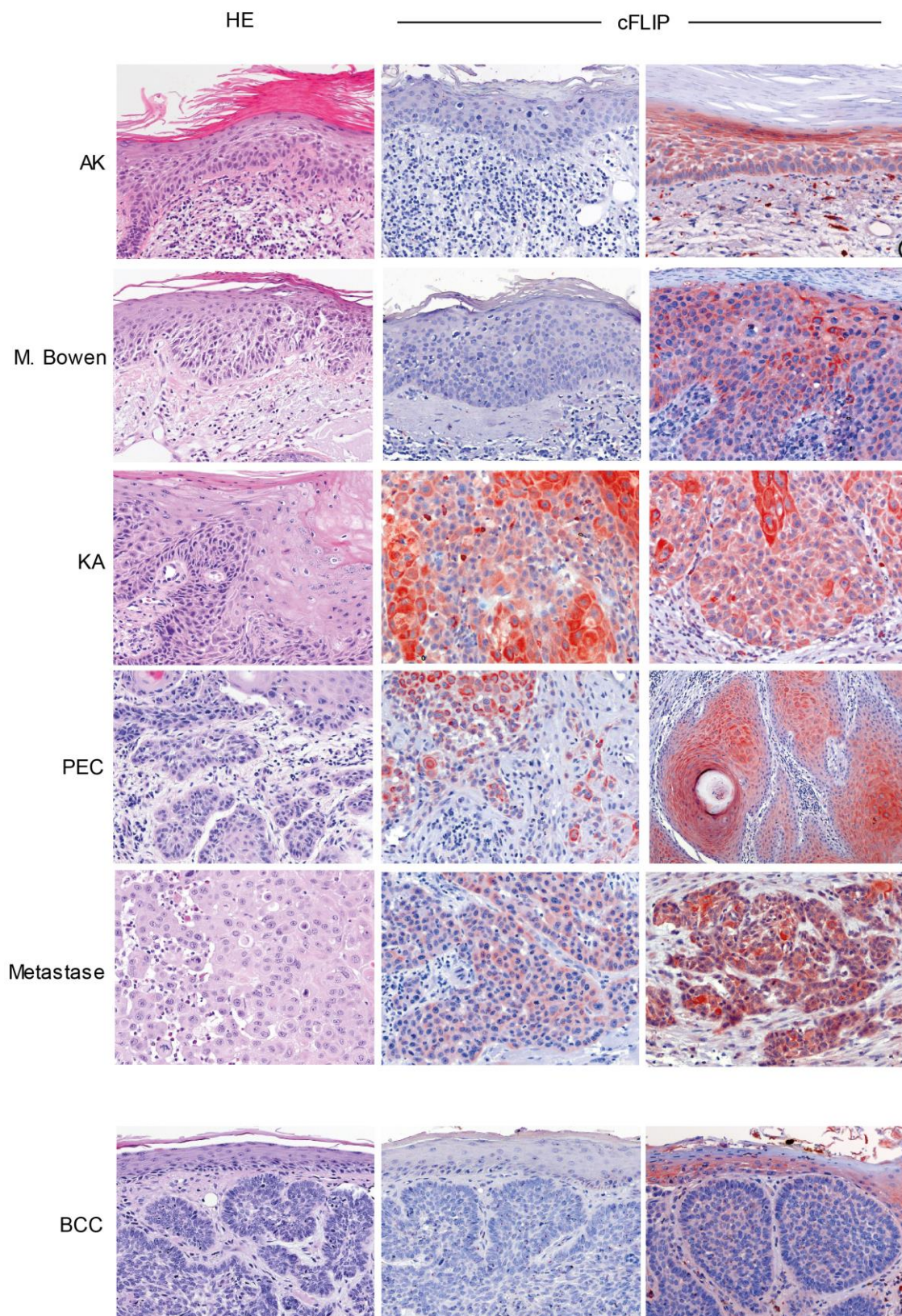
Interessanterweise konnte in keinem der analysierten Basalzellkarzinome cFLIP immunhistochemisch nachgewiesen werden (Tab. 2 und Abb. 9), wohingegen in jeweils acht von 20 Fällen bei aktinischen Keratosen und dem M. Bowen eine Expression belegt werden konnte. In Einklang mit den bislang publizierten Daten zur cFLIP-

Expression in epithelialen Geweben zeigte sich in 100% der Keratoakanthome (TD von 1,2 mm bis 7,0 mm  $\pm$  1,44 SD) eine zum Teil erhebliche Expression von cFLIP (Tab. 2 und Abb. 9), was sich in 95% der Fälle auch für die überwiegend gut differenzierten Plattenepithelkarzinome (TD von 0,7 mm bis 10,0 mm  $\pm$  2,57 SD) bestätigte.

Die hohe Rate einer cFLIP-Überexpression im primären kutanen Plattenepithelkarzinom deckt sich mit dem Befund, dass alle untersuchten metastasierten Plattenepithelkarzinome der Haut cFLIP exprimierten.

<b>Epithelialer Tumor</b>	<b>cFLIP-Expression</b>
Basalzellkarzinom	0/20 (0 %)
aktinische Keratose	8/20 (40 %)
Morbus Bowen	8/20 (40 %)
Keratoakanthom	20/20 (100 %)
kutanes Plattenepithelkarzinom	19/20 (95 %)
Plattenepithelkarzinom-metastase	10/10 (100 %)

**Tabelle 2:** cFLIP-Expression in epithelialen Tumoren der Haut.



**Abbildung 9:** cFLIP-Expression in epithelialen Tumoren (200-fache Vergrößerung). AK = Aktinische Keratose, BCC = Basalzellkarzinom, KA = Keratoakanthom, M. Bowen = Morbus Bowen, PEC = Plattenepithelkarzinom

### 3.2.2 Melanozytäre Tumoren

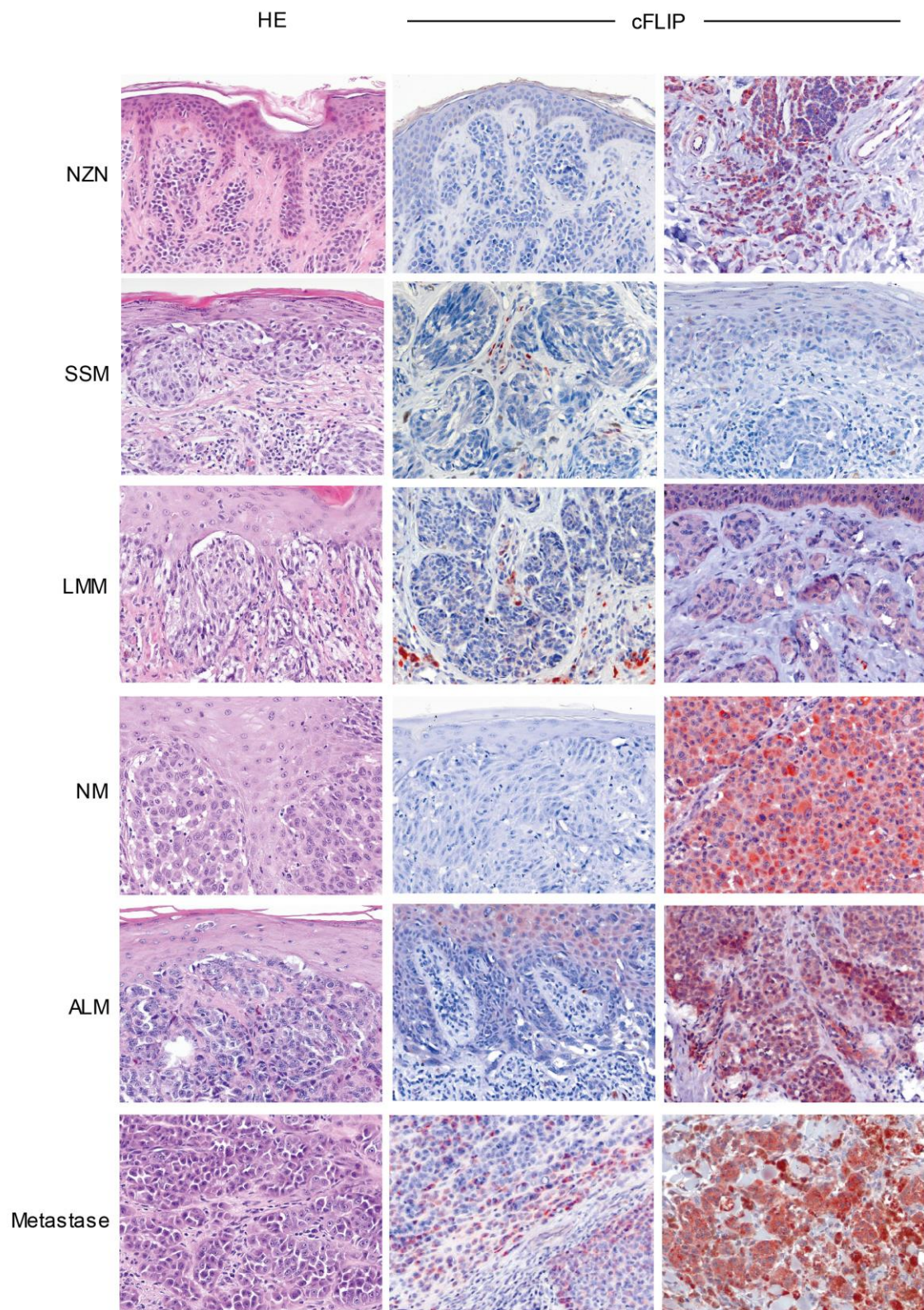
Die bisherigen Untersuchungen bezüglich der cFLIP Expression in melanozytären Tumoren der Haut beschränken sich nahezu ausschließlich auf die Analyse von Zelllinien. Daher erfolgte in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemische Analyse melanozytärer Tumoren der Haut. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die verschiedenen Subtypen des malignen Melanoms gelegt, um zu untersuchen, ob und inwiefern sich die cFLIP-Expression zwischen den verschiedenen Subtypen unterscheidet. Klinisch und histologisch können vier verschiedene Subtypen unterschieden werden: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM) sowie das akral-lentiginöse Melanom (ALM). Die Auswahl der untersuchten Melanommetastasen erfolgte ohne Kenntnis über den histologischen Subtyp des Primärtumors.

Die immunhistochemische Analyse melanozytärer Tumoren führte zu folgendem Ergebnis: In sieben der 20 untersuchten Nävi konnte cFLIP nachgewiesen werden (Tab. 3 und Abb. 10). Bezüglich der Subtypen des malignen Melanoms ließ sich folgende Aussage treffen: drei von 20 Präparaten des superfiziell spreitenden Melanoms (TD von 0,6 mm bis 4,5 mm  $\pm$  0,93 SD) zeigten sich immunhistochemisch positiv für cFLIP. Ähnlich war die Anzahl der positiven Lentigo-maligna-Melanome (TD von 0,3 mm bis 5,0 mm  $\pm$  1,41 SD). Hier konnte ebenfalls in drei von 20 Präparaten cFLIP nachgewiesen werden. Außerdem gelang in fünf von 20 untersuchten Präparaten des akral-lentiginösen Melanoms (TD von 1,0 mm bis 7,0 mm  $\pm$  1,66 SD) der Nachweis von cFLIP. Einen weitaus höheren Prozentsatz cFLIP-positiver Präparate ergab die Analyse des nodulären Melanoms (TD von 1,2 mm bis 6,0 mm  $\pm$  1,75 SD) mit 13 von 20 positiven Präparaten. Außerdem konnte cFLIP in zwölf der 20 untersuchten Melanommetastasen nachgewiesen werden.

Melanozytärer Tumor	cFLIP-Expression
Nävuszellnävus	07/20 (35 %)
Superfiziell spreitendes Melanom	3/20 (15 %)
Lentigo-maligna-Melanom	2/20 (10 %)
Noduläres Melanom	13/20 (65 %)
Akral-lentiginöses Melanom	5/20 (25 %)
Melanommetastase	12/20 (60 %)

**Tabelle 3:** cFLIP-Expression in melanozytären Tumoren.





**Abbildung 10:** cFLIP-Expression in melanozytären Tumoren (200-fache Vergrößerung). ALM = akral lentiginöses Melanom, LMM = Lentigo maligna Melanom, NM = noduläres Melanom, NZN = Nävuszellnävus, SSM = superfiziell spreitendes Melanom

Darüber hinaus erfolgte in insgesamt zehn Fällen die immunhistochemische Analyse sowohl des Primärtumors als auch einer zugehörigen Melanommetastase desselben Patienten. Bei dem Primarius handelte es sich in sechs Fällen um ein superfiziell spreitendes Melanom und in zwei Fällen um ein noduläres Melanom. In zwei weiteren Fällen war eine eindeutige Klassifizierung des Primarius nicht möglich. Bei den untersuchten Melanommetastasen handelte es sich um drei subkutane, zwei dermale sowie fünf Lymphknotenmetastasen. In insgesamt sechs Fällen gelang weder im Primarius noch in der jeweiligen Melanommetastase der Nachweis von cFLIP. In einem superfiziell spreitenden Melanom mit einer Tumordicke von 2,5 mm konnte eine Expression von cFLIP belegt werden, während die zugehörige Lymphknotenmetastase sich immunhistochemisch negativ für cFLIP zeigte (Tab. 4). Umgekehrt konnte in einem weiteren Primärtumor dessen Klassifizierung nicht eindeutig möglich war, cFLIP nicht detektiert werden, wohingegen sich hier die Lymphknotenmetastase immunhistochemisch positiv für cFLIP zeigte. In zwei weiteren Fällen, einem regressiv veränderten, superfiziell spreitenden Melanom, Tumordicke 0,7 mm, sowie einem nodulären Melanom, Tumordicke 0,9 mm, gelang sowohl im Primärtumor als auch in den jeweiligen Metastasen (einer subkutanen Melanommetastase sowie einer Lymphknotenmetastase) der immunhistochemische Nachweis einer Expression von cFLIP.

<b>Primarius</b>	<b>Metastase</b>
SSM (+)	Lymphknoten (-)
SSM (+)	subkutan (+)
SSM (-)	subkutan (-)
SSM (-)	subkutan (-)
SSM (-)	dermal (-)
SSM (-)	dermal (-)
NM (-)	Lymphknoten (-)
NM (+)	Lymphknoten (+)
nicht klassifizierbar (-)	Lymphknoten (+)
nicht klassifizierbar (-)	Lymphknoten (-)

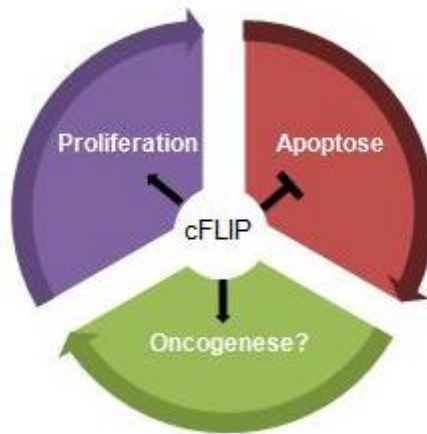
**Tabelle 4:** cFLIP-Expression im Primarius und zugehöriger Metastase. (+) = Nachweis von cFLIP, (-) = kein Nachweis von cFLIP, NM = noduläres Melanom, SSM = superfiziell spreitendes Melanom

## 4 Diskussion

Vorausgegangene Untersuchungen verdeutlichen, dass cFLIP ein bedeutender Regulator der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist (Irmeler et al. 1997, Wachter et al. 2004). Durch die rezeptornahe Hemmung der Aktivierung von Procaspase-8 innerhalb des DISC kann cFLIP die apoptotische Signalkaskade sehr effektiv inhibieren (Irmeler et al. 1997, Krueger et al. 2001b, Mathas et al. 2004, Leverkus et al. 2008). Dies hat zur Folge, dass jegliche Form der Fehlregulation in der Expression von cFLIP weitreichende Konsequenzen für Wachstum und Überleben einer Zelle haben kann. Es ist denkbar, dass eine cFLIP-vermittelte Apoptoseresistenz einzelnen Zellen die Möglichkeit einer ungehinderten Proliferation eröffnet und damit einen von mehreren Bausteinen für die potenzielle Entstehung von Tumoren darstellen könnte (Leverkus et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte durch einen immunhistochemischen Nachweis von cFLIP an Paraffin-eingebettetem Gewebe gezeigt werden, dass cFLIP differenziell in verschiedenen Tumoren der Haut exprimiert wird.

Die These, dass cFLIP einen wichtigen Anteil an der Tumorgenese haben könnte, wird durch den Nachweis erhöhter Konzentrationen von cFLIP in verschiedenen Tumorentitäten gestützt. Gezeigt werden konnte dies beispielsweise in Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms (Dutton et al. 2004, Mathas et al. 2004). Ebenso gelang in einigen Zelllinien verschiedener Tumoren (Magen-, Kolon-, Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinom) der Nachweis hoher cFLIP-Konzentrationen (Nam et al. 2003, Shirley und Micheau 2010). Auch in Melanom-Zelllinien konnte anhand von Western Blot-Analysen ein hoher intrazellulärer cFLIP-Gehalt nachgewiesen werden (Irmeler et al. 1997, Griffith et al. 1998). Bullani et al. gelang zudem der immunhistochemische Nachweis von cFLIP in superfiziell spreitenden und nodulären Melanomen sowie kutanen Melanommetastasen (Bullani et al. 2001). Basierend auf diesem Ergebnis konnte *in vitro* gezeigt werden, dass cFLIP-überexprimierende Jurkat-Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose aufweisen (Bullani et al. 2001). Im Umkehrschluss konnten Geserick et al. zeigen, dass die forcierte Herunterregulation von cFLIP mittels siRNA in Melanom-Zelllinien zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TRAIL-/ CD95-vermittelter Apoptose führte (Geserick et al. 2008). Anhand der bisherigen Erkenntnisse liegt also die Vermutung nahe, dass cFLIP durch die Hemmung der intrazellulären Weiterleitung Todesrezeptor-vermittelter Signale als (Proto-) Onkogen

bei der Entstehung und Proliferation/Progression maligner Erkrankungen fungieren könnte (Leverkus et al. 2008, Safa 2012).



**Abbildung 11:** Potenzielle Rolle von cFLIP in Bezug auf Zellwachstum und Differenzierung (eigene Abbildung).

Zum immunhistochemischen Nachweis von cFLIP an Paraffin-eingebettetem Gewebe wurde ein käuflich erworbener, monoklonaler Maus-Antikörper (G11, Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt. Vor der Verwendung erfolgte zunächst die Überprüfung der Spezifität des Antikörpers mittels Western Blot. Hierbei zeigten sich wie in Abb. 7 ersichtlich deutliche Banden bei 55 kDa und 26 kDa, welche exakt den bekannten Molekulargewichten der beiden Splicevarianten cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> entsprechen. Im Anschluss an die Western Blot-Analyse wurde die Spezifität des Antikörpers zusätzlich anhand einer cFLIP-überexprimierenden, Formalin-fixierten Zellkultur *in situ* geprüft. Dabei konnte, wie in Abb. 8 gezeigt, das Ergebnis des Western Blots bestätigt werden. Aus den durchgeführten Untersuchungen lässt sich ableiten, dass der verwendete Antikörper G11 sowohl cFLIP<sub>L</sub> als auch cFLIP<sub>S</sub> spezifisch nachweist und für den immunhistochemischen Nachweis von cFLIP geeignet ist. Im Gegensatz dazu erwies sich ein monoklonaler anti-cFLIP Kaninchen-Antikörper als unspezifisch, was nach entsprechender Mitteilung an die herstellende Firma zu einer Einstellung der Produktion führte.

Der Nachweis beider Isoformen von cFLIP durch den verwendeten Antikörper G11 führt zu der Frage nach einer differenzierten Betrachtung von cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub>. Dabei wäre beispielsweise von Interesse, ob einige der untersuchten Tumoren nur eine der beiden Isoformen synthetisieren oder ob Unterschiede im prozentualen Verhältnis bei-

der Splicevarianten zueinander nachweisbar sind. Gerade in Hinblick auf die in Teilbereichen divergenten Auswirkungen auf Apoptose, Nekroptose oder alternative Funktionen wie die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges wird die Relevanz des Einzelnachweises beider Isoformen deutlich (Chang et al. 2002, Fricker et al. 2010, Neumann et al. 2010, Feoktistova und Leverkus 2016). Publierte Untersuchungen von Tumorzelllinien und verschiedenen Primärtumoren (z.B. kolorektales Karzinom, Ovarialkarzinom) zeigen, dass in malignen Zellen/Geweben vor allem die Isoform cFLIP<sub>L</sub> überexprimiert wird (Shirley and Micheau 2010). Zusätzlich existieren auch Untersuchungen, die eine Überexpression von cFLIPs in Tumorzelllinien beschreiben (Nam et al. 2003, Mori et al. 2005, Salon et al. 2006). Aktuell sind allerdings nach unserem Wissensstand für den separaten immunhistochemischen Nachweis von cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> an Paraffinschnitten keine ausreichend spezifischen Antikörper verfügbar. Sobald geeignete Antikörper zur Verfügung stehen, sollte zur Beantwortung dieser wichtigen Frage eine getrennte immunhistochemische Analyse beider Isoformen erfolgen.

Wie bereits erwähnt, nimmt cFLIP eine zentrale Rolle als Regulator der Apoptose ein und eine vermehrte Expression kann als Hinweis auf eine Fehlregulation der Apoptose gedeutet werden. Besonders einleuchtend erscheint dieses Konzept bei unserer Analyse der verschiedenen epithelialen Hauttumoren. Dabei konnte lediglich in acht der 20 untersuchten Präparate von aktinischen Keratosen und Morbi Bowen cFLIP nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis erscheint insofern plausibel, da es sich hierbei um sogenannte *in situ*-Karzinome, also mögliche frühe Vorläuferläsionen eines manifesten Plattenepithelkarzinoms handelt. Beim Übergang der Läsionen in ein Karzinom ist der zeitliche Verlauf von entscheidender Bedeutung. Dementsprechend könnten cFLIP-positive *in situ*-Karzinome den drohenden Übergang bzw. einen zeitlichen Progressionsfaktor eines initialen Plattenepithelkarzinoms darstellen. Im Gegensatz dazu wiesen fast ausnahmslos alle untersuchten Paraffinschnitte des Plattenepithelkarzinoms eine cFLIP-Expression auf. Dieses Resultat deckt sich mit dem Nachweis erhöhter Mengen von cFLIP in einer Reihe weiterer epithelialer Tumoren wie z.B. dem Prostata- oder Ovarialkarzinom (Xiao et al. 2003, Zhang et al. 2004, Shirley und Micheau 2010). Auch immunhistochemisch konnte mittels eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers eine erhöhte cFLIP-Expression bei am Kopf oder am Hals lokalisierten Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Li et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein eindeutiger Trend bezüglich des Differenzierungsgrades (von gut differenziert bis undifferenziert) der Tumoren festgestellt werden. Daher sollte in weiterführenden Arbeiten anhand größerer Fallzahlen ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Grad der Differenzierung der Tumoren und der Expression von cFLIP untersucht werden. Insbesondere bei Metastasen kutaner Hauttumoren ist zu diskutieren, ob cFLIP einen möglichen Promotionsfaktor darstellt. Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis von cFLIP in allen untersuchten Plattenepithelkarzinommetastasen. Auch bisherige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ein erhöhter intrazellulärer cFLIP-Gehalt Tumoren zu einem aggressiveren Wachstum verhelfen kann und potenziell mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Djerbi et al. 1999, Shirley und Micheau 2010, Harris et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde im Fall der epithelialen Hauttumoren pro Patient nur ein anonymisierter Gewebeschnitt verwendet, wodurch ein möglicher Zusammenhang zwischen Primarius und Metastase wegen des Aufbaus der Studie weder belegt noch verneint werden kann. Um einen putativen Einfluss von cFLIP auf die Metastasierung von Hauttumoren zu überprüfen, wäre ein Vergleich einer größeren Anzahl von Primärtumoren und Metastasen desselben Patienten von großem Interesse und sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Ebenso konnte in allen 20 Präparaten des Keratoakanthoms cFLIP nachgewiesen werden. Dies erscheint insofern plausibel, da es sich beim Keratoakanthom um ein hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit der Tendenz zur spontanen Regression handelt. Die enge Verbindung beider Tumorentitäten wird zudem durch Veröffentlichungen belegt, die den äußerst seltenen Fall einer Metastasierung klinisch und histopathologisch gesicherter Keratoakanthome beschreiben (Hodak et al. 1993, Davis et al. 2006). Tatsächlich könnte genauso wie bei Plattenepithelkarzinomen die Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges durch cFLIP einen von mehreren Faktoren darstellen, der zur ungemein schnellen Proliferation dieses Tumors innerhalb weniger Wochen beiträgt. Dies wäre eine denkbare Erklärung für die verstärkte Expression von cFLIP in jedem der untersuchten Präparate. Darauf aufbauend wirft die enge Verwandtschaft beider Tumorentitäten unweigerlich die Frage auf, welche Mechanismen zur Regression des Keratoakanthoms führen, da kutane Plattenepithelkarzinome typischerweise eher selten metastasieren, aber nicht die Fähigkeit zur Spontanregression besitzen. Bislang sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unvollständig verstanden. Während cFLIP hier-

bei eine nebensächliche Rolle spielen dürfte, scheinen zytotoxische T-Zellen im Zentrum des Geschehens zu stehen (Batinac et al. 2006). In einer 2006 veröffentlichten Publikation äußern Batinac et al. die Vermutung, dass die durch zytotoxische T-Zellen vermittelte Ausschüttung von Granzym B entscheidend an der Tumorregression beteiligt sein könnte (Batinac et al. 2006). Hierbei handelt es sich um eine Serinprotease, die durch direkte Aufnahme in das Zytoplasma von Zielzellen unter Umgehung der Todesrezeptoren apoptotisch wirkt. Daher können die Tumorzellen nicht durch eine erhöhte Expression von cFLIP geschützt werden, da cFLIP nur in das Todesrezeptor-Signal eingreift. Untermuert wird diese Hypothese durch den Nachweis einer signifikant erhöhten Expression von Granzym B in Gewebeproben sich in Regression befindlicher Keratoakanthome (Batinac et al. 2006).

Im Gegensatz dazu gelang in keinem der untersuchten Basalzellkarzinome der Nachweis von cFLIP. Erklärbar ist dies zunächst dadurch, dass es sich hierbei um keinen klassischen epithelialen Tumor handelt. Histogenetisch entstammt das Basalzellkarzinom den Zellen der Basalzellschicht bzw. der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel (S2k-Leitlinie 032-021 Basalzellkarzinom Aktualisierung 2017/18, Kump et al. 2008). Für das lokal invasive und destruierende Wachstum dieses Tumors scheinen also gemäß den Ergebnissen unserer Untersuchungen andere Faktoren als cFLIP ausschlaggebend zu sein. Zu einem abweichenden Ergebnis kommen Kump et al. (Kump et al. 2008). In der genannten Veröffentlichung wird ein Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor „Glioma associated 2“ (Gli2) und der Regulation der Expression von cFLIP in Basalzellkarzinomen hergestellt (Kump et al. 2008). Demnach kann Gli2 über die Bindung an der Promoterregion von cFLIP die Expression des Proteins steigern. Zum immunhistochemischen Nachweis von cFLIP kam hierbei ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper zum Einsatz (Bachmann et al. 2001). Möglicherweise könnten also die voneinander abweichenden Ergebnisse unserer Analyse sowie der genannten Publikation durch Unterschiede in der Spezifität der jeweils verwendeten Antikörper bedingt sein.

Durch vorhergehende Arbeiten konnte bereits in einer Vielzahl verschiedener Tumoren eine erhöhte intrazelluläre cFLIP-Konzentration nachgewiesen werden (Shirley und Micheau 2010). Während diese sich beinahe ausschließlich auf die *in vitro*-Analysen von cFLIP in Melanomzelllinien konzentrierten (Griffith et al. 1998, Geserick et al.

2008), erfolgte in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemische Analyse verschiedener melanozytärer Hauttumoren anhand von Paraffinschnitten. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit bisher publizierten Studien und belegen eine cFLIP-Expression in melanozytären Hauttumoren. Zunächst konnten in sieben der 20 untersuchten Präparate gewöhnlicher melanozytärer Nävi cFLIP nachgewiesen werden. Einen ähnlichen Trend zeigt die immunhistochemische Analyse benigner melanozytärer Nävi in einer früheren Veröffentlichung (Bullani et al. 2001). Hierbei konnte mittels zweier polyklonaler Kaninchen-Antikörper in einem von 23 untersuchten gewöhnlichen melanozytären Nävi cFLIP nachgewiesen werden (Bullani et al. 2001). Eine denkbare Erklärung für die abweichenden Prozentzahlen liegt in der Heterogenität der Gruppe der benignen melanozytären Nävi. Während in unserer Arbeit vorwiegend „kongenitale Nävuszellnävi vom oberflächlichen Typ“ analysiert wurden, erfolgte in der davor genannten Publikation eine Untersuchung 23 „gewöhnlicher Nävi“ sowie 9 „atypischer Nävi“ (Bullani et al. 2001). Um exaktere Angaben in Bezug auf die cFLIP-Expression benigner melanozytärer Nävi treffen zu können wäre somit eine Analyse größerer Fallzahlen mit einer genauen Aufgliederung verschiedener Subtypen notwendig. Dennoch deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass cFLIP möglicherweise ähnlich wie *B rapidly accelerated fibrosarcoma* (BRAF) in gewöhnlichen melanozytären Nävi exprimiert wird ohne (allein) ein onkogenes Potenzial zu besitzen (Pollock et al. 2003, Shitara et al. 2015). Sicherlich stellt sich auch hier die Frage nach der Untersuchung einer größeren Anzahl dysplastischer Nävi, die gemäß dieser Hypothese analog zu BRAF auch cFLIP exprimieren müssten (Hussein 2004, Shitara et al. 2015). Bei der Analyse der verschiedenen Subtypen melanozytärer Tumore zeigten sich drei der untersuchten SSM, zwei der LMM sowie fünf ALM immunhistochemisch positiv für cFLIP. Im Hinblick auf die Hypothese, dass cFLIP durch Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges einen von vielen Bausteinen bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen darstellen könnte, erscheint dieses Ergebnis plausibel. Belegt wird dies auch durch eine Vielzahl von Publikationen, in denen ein Zusammenhang zwischen der cFLIP-Expression in Melanomzelllinien sowie der Resistenz gegenüber TRAIL-/CD95-vermittelter Apoptose belegt wird (Irmeler et al. 1997, Griffith et al. 1998, Medema et al. 1999, Geserick et al. 2008). Bei Betrachtung des Ergebnisses unserer Analyse fällt auf, dass in dreizehn von 20 untersuchten nodulären Melanomen cFLIP nachgewiesen werden konnte. Die



Prozentzahl positiver Präparate fällt im Vergleich zu den anderen Melanom-Subtypen also deutlich höher aus. Interessanterweise führte die immunhistochemische Analyse von Bullani et al. zu einem sehr ähnlichen Ergebnis (Bullani et al. 2001). Auch in dieser Arbeit war die cFLIP-Expression im nodulären Melanom gegenüber dem superfiziell spreitenden Melanom deutlich erhöht (Bullani et al. 2001). Das noduläre Melanom ist gekennzeichnet durch eine aggressive vertikale Wachstumstendenz und weist daher tendenziell eine im Vergleich zu den anderen Subtypen schlechtere Prognose auf (Garbe et al. 2016). Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob die Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges mittels cFLIP am schnellen Wachstum des Tumors beteiligt sein könnte. Erste Anhaltspunkte dafür liefern Publikationen, wonach erhöhte intrazelluläre cFLIP-Level mit einem aggressiveren Tumorwachstum korrelieren können (Djerbi et al. 1999). Erwähnenswert sind auch Untersuchungen, wonach die cFLIP-Expression in Non-Hodgkin-Lymphomen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben könnte (Valente et al. 2006). In Zusammenschau der Befunde sind in Bezug auf das noduläre Melanom vertiefende Untersuchungen notwendig, um mehr über die Faktoren zu erfahren, die zum aggressiven Wachstum dieser Tumorentität beitragen. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Analyse der Melanommetastasen. Für die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms wurden in den letzten Jahren eine Reihe neuer Therapien eingeführt, die auf dem Nachweis von Mutationen basieren (Eggermont et al. 2014). Dennoch dauert die Suche nach weiteren, möglicherweise pharmakologisch interessanten Targets weiterhin an. Dies verdeutlicht die Komplexität der Ätiopathogenese des Melanoms. Der Nachweis von cFLIP in mehr als der Hälfte der untersuchten Melanommetastasen kann als Indikator dafür gesehen werden, dass cFLIP als Inhibitor CD95-vermittelter Apoptose möglicherweise als Progressionsfaktor bei der Metastasierung von Melanomen fungieren könnte. Hinweis dafür geben auch Untersuchungen anderer Autoren, die zeigen, dass die Hemmung Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch Verlust der Expression von CD95-Rezeptoren die Progression der Bildung von Lungenmetastasen von Melanomzelllinien im Tiermodell beschleunigen kann (Owen-Schaub et al. 1998). Um erste Erkenntnisse über einen möglichen Einfluss von cFLIP auf die Progression und Metastasierung von Melanomen zu gewinnen, erfolgte im Fall der melanozytären Hauttumoren anhand von zehn Präparaten die immunhistochemische Analyse sowohl des Primärtumors als auch einer zugehörigen Metastase desselben Patienten. Hierbei konnte in

einem superfiziell spreitenden Melanom eine Expression von cFLIP belegt werden, während sich die zugehörige Lymphknotenmetastase immunhistochemisch negativ für cFLIP zeigte. Umgekehrt konnte in einem weiteren Primärtumor, dessen Klassifizierung nicht eindeutig möglich war, cFLIP nicht detektiert werden, wohingegen sich hier die Lymphknotenmetastase immunhistochemisch positiv für cFLIP zeigte. In zwei weiteren Fällen, einem regressiv veränderten, superfiziell spreitenden Melanom sowie einem nodulären Melanom, gelang sowohl im Primärtumor als auch in den jeweiligen Metastasen der immunhistochemische Nachweis einer Expression von cFLIP. Zusammenfassend ist es anhand der kleinen Fallzahl und der Heterogenität nur schwer möglich, eine fundierte Aussage über eine mögliche Beteiligung von cFLIP an der Progression und Metastasierung von Melanomen zu treffen.

Eine interessante Frage ist auch, ob die verstärkte Expression von cFLIP mit dem Gesamtüberleben der betroffenen Patienten korreliert. Erste Anhaltspunkte zur Beantwortung dieser Frage liefern Untersuchungen zur cFLIP-Expression in Non-Hodgkin-Lymphomen. Denn ebenso wie für die Pathogenese von Hauttumoren spielt die Hemmung von Apoptose eine essenzielle Rolle bei der Entstehung von Lymphomen (Van Houdt et al. 2007). Harris et al. befassten sich mit der Fragestellung, ob die cFLIP-Expression in verschiedenen Subtypen diffuser, großzelliger B-Zell-Lymphome mit dem klinischen Outcome der betroffenen Patienten korreliert (Harris et al. 2012). Dabei konnten deutliche Unterschiede sowohl in Bezug auf das 5-Jahres-progressionsfreie Überleben als auch in Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben im Vergleich von cFLIP-positiven und cFLIP-negativen Tumoren festgestellt werden (Harris et al. 2012). Diese Ergebnisse decken sich mit weiteren Untersuchungen, die die Auswirkungen der cFLIP-Expression auf das Gesamtüberleben beim Burkitt-Lymphom sowie in niedrig malignen Lymphomen beleuchten (Valnet-Rabier et al. 2005, Valente et al. 2006). Unter Würdigung der Heterogenität dieser Gruppe von Tumoren lässt dies vermuten, dass cFLIP einen prognostischen Marker sowie ein interessantes Target für die zukünftige Diagnostik und Therapie von Lymphomen darstellen könnte. Sicherlich lassen sich diese Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf Hauttumoren übertragen. Dennoch sollte es, basierend auf diesen Erkenntnissen, das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, unter Berücksichtigung von wichtigen Einflussfaktoren wie beispielsweise Geschlecht, Alter und Komorbiditäten zu untersuchen, ob die cFLIP-Expression in Plattenepithelkarzino-

men oder Melanomen einen relevanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten haben kann.

Bekanntermaßen stellt die UV-Exposition einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung epithelialer und melanozytärer Hauttumore dar (Feller et al. 2016). Als gefährlich gilt in Abhängigkeit von der jeweiligen Tumorentität die intermittierende oder chronisch-kumulative UV-Dosis (Rudolph et al. 2015, Feller et al. 2016). Dies führt zu der Fragestellung, ob die UV-Exposition ebenfalls einen Einfluss auf die cFLIP-Expression in Hauttumoren haben könnte. Unsere Analyse zeigte, dass in jedem der untersuchten Paraffinschnitte des Keratoakanthoms cFLIP nachgewiesen werden konnte. Die Mehrheit der untersuchten Präparate entstammt stark sonnenlichtexponierten Arealen wie dem Gesicht oder den Handrücken. Gleiches gilt für die untersuchten Plattenepithelkarzinome der Haut. Auch in diesem Subtyp epithelialer Hauttumore konnte in einem Großteil der an Kopf und Handrücken lokalisierten Tumor cFLIP nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der untersuchten Basalzellkarzinome cFLIP nachgewiesen werden, obwohl auch diese Tumorentität vorwiegend an UV-exponierten Arealen lokalisiert ist. Zusammenfassend kann auf Grundlage der vorliegenden Arbeit also keine Aussage darüber getroffen werden, ob Sonnenlicht eine Auswirkung auf die Expression von cFLIP in epithelialen und melanozytären Tumoren der Haut hat.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die frühe Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges durch das anti-apoptische Protein cFLIP an der Entstehung und dem Wachstum epithelialer und melanozytärer Hauttumore beteiligt sein könnte. Ein möglicher Einfluss auf die Tumorprogression bis hin zur Metastasierung wird durch die hohe Anzahl cFLIP-positiver Plattenepithel- und Melanommetastasen verdeutlicht. Nichtsdestotrotz muss daran erinnert werden, dass cFLIP als bedeutender Regulator Todesrezeptor-vermittelter Apoptose nur einen von vielen Bausteinen darstellt, die in ihrer Gesamtheit an der Tumorentstehung beteiligt sein dürften. Dies wird im Hinblick auf den Anteil cFLIP-negativer Metastasen des Melanoms deutlich, bei denen andere Faktoren als cFLIP, die z.B. zur Zellzyklushemmung führen können, im Vordergrund stehen müssen.

## 5 Zusammenfassung

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose stellt einen zentralen Baustein in der Pathogenese von Tumorerkrankungen dar. cFLIP inhibiert rezeptornah die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose und spielt somit eine bedeutende Rolle als Regulator der Apoptose. Eine verstärkte Expression von cFLIP kann folglich hinweisend auf eine Fehlregulation der Apoptose bei der Entstehung und Progression von Tumoren sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von cFLIP in kutanen epithelialen und melanozytären Tumoren mit formalinfixierten und paraffinierten Gewebeproben untersucht. Bei der zunächst durchgeführten Charakterisierung der käuflich erhältlichen monoklonalen cFLIP-Antikörper mittels cFLIP-überexprimierenden HaCaT-Keratinocyten wurde überraschenderweise die fehlende Spezifität eines Antikörpers (KlonEPR8438(2)) nachgewiesen, was zur Folge hatte, dass der Hersteller die Produktion nach Mitteilung der Befunde eingestellt hat. Daher wurden die weiteren Untersuchungen unter Verwendung des Antikörper-Klons G11, der sowohl im Western Blot als auch immunhistochemisch die beiden cFLIP-Splicevarianten cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> spezifisch nachweist, durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass cFLIP in epithelialen Hauttumoren in erheblichem Maß exprimiert wird. In jeweils 40% der untersuchten aktinischen Keratosen und Morbi Bowen konnte cFLIP nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte sich in den fortgeschrittenen Formen epithelialer Hauttumoren eine deutlich höhere Expressionsrate. Eine Expression wiesen zudem 100% der untersuchten Keratoakanthome und 95% der Plattenepithelkarzinome (mit überwiegend gutem Differenzierungsgrad) auf. Dementsprechend war es nicht verwunderlich, dass alle untersuchten Metastasen von Plattenepithelkarzinomen cFLIP überexprimierten.

Die Analyse melanozytärer Läsionen ergab, dass cFLIP in melanozytären Nävi wie auch superfiziell spreitenden Melanomen, Lentigo-maligna-Melanomen und akral-lentiginösen Melanomen nur in einer sehr geringen Anzahl der untersuchten Präparate überexprimiert wurde. Erstaunlicherweise konnte jedoch in 65% der nodulären Melanome sowie in 60% der Melanommetastasen cFLIP nachgewiesen werden. Bezüglich der Expression von cFLIP im Primärtumor sowie der Metastase desselben Patienten konnte kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die frühe Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges durch das anti-

apoptotische Protein cFLIP an der Entstehung, dem Wachstum und möglicherweise der Metastasierung epithelialer Hauttumore beteiligt sein dürfte. Die auffallend hohe Expressionsrate im nodulären Melanom sowie den untersuchten Melanommetastasen könnte einen zukünftigen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams JM** (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes dev* 17: 2481-2495
- Aggarwal BB**, Gupta SC and Kim JH (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 19:651-65
- Alnemri ES**, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
- Arbeitsgemeinschaft** der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S2k-Leitlinie 032-021 „Basalzellkarzinom“ (Aktualisierung 2017/18) [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-021\\_S2k\\_Basalzellkarzinom-der-Haut\\_2018-09\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-021_S2k_Basalzellkarzinom-der-Haut_2018-09_01.pdf) (Zugriff am 18.02.2019)
- Armbruster N**, Trautmann A, Bröcker E-B, Leverkus M and Kerstan A (2009) Suprabasal spongiosis in acute eczematous dermatitis: cFLIP maintains resistance of basal keratinocytes to T-cell-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 129: 1696-1702
- Ashkenazi A** and Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308
- Ashwell JD**, Berger NA, Cidlowski CA, Lane DP and Korsmeyer SJ (1994) Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunol Today* 15: 147-151
- Bachmann F**, Buechner SA, Wernli M, Strelbel S and Erb P (2001) Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J Invest Dermatol* 117: 59-66.
- Batinac T**, Zamolo G, Hadzisejdic I and Zauhar G (2006) A comparative study of granzyme B expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 44: 109-112.
- Best SM** (2008) Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol* 62: 171-192

- Braun** FK, Mathur R, Sehgal L, Wilkie-Grantham R, Chandra J, Berkova Z and Samaniego F (2015) Inhibition of methyltransferases accelerates degradation of cFLIP and sensitizes B-cell lymphoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *PLoS One* 10: e 0117994
- Bredesen** DE (1995) Neural Apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851
- Budd** RC, Yeh WC and Tschopp J (2006) cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6: 196-204
- Bullani** RR, Huard B, Viard-Leveugle I, Byers HR, Irmeler M, Saurant JH, Tschopp J and French E (2001) Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 117: 360-364
- Chang** DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yais-Ohad S, Peter ME and Xang X (2002) c-FLIP<sub>L</sub> is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 21: 3704-3714
- Chipuk** JE and Green DR (2008) How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18: 157-164
- Cohen** GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
- Corry** S and Adams JM (2002) The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656
- Daniel** PT, Wieder T, Sturm I and Schulze-Osthoff K (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15: 1022-1032
- Davis** BA, Monheit GD and Kline L (2006) Metastatic skin cancer presenting as ptosis and diplopia. *Dermatol Surg* 32: 148-158
- Detergeev** A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA and Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1: 112-119

**Dhein J**, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Möller P and Krammer PH (1992) Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149: 3166-3173

**Dickens LS**, Powley IR, Hughes MA and MacFarlane M (2012) The ‘complexities’ of life and death: Death receptor signaling platforms. *Exp Cell Res* 318: 1269-1277

**Diessenbacher P**, Hupe M, Sprick MR, Kerstan A, Geserick P, Haas TL, Wachter T, Neumann M, Walczak H, Silke J and Leverkus M (2008) NF-kappaB inhibition reveals differential mechanisms of TNF versus TRAIL-induced apoptosis upstream or at the level of caspase-8 activation independent of cIAP2. *J Invest Dermatol* 128: 1134-1147

**Djerbi M**, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P and Grandien A (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190: 1025-1032

**Dutton A**, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS and Murray PG (2004) Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6611-6616

**Eggermont AM**, Spatz A and Robert C (2014) Cutaneous melanoma. *Lancet* 383: 816-827

**Elmore S** (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516

**Elnemr A**, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fukushima S, Nishimura GI, Shimizu K and Miwa K (2001) Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol* 18: 311-316

**Feller L**, Khammissa RA, Kramer B, Altini M and Lemmer J (2016) Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Had Face Med* 12:11



**Feoktistova M** and Leverkus M (2016) Programmed necrosis and necroptosis signaling. *FEBS J* 282: 19-31

**Feoktistova M**, Wallberg F, Tenev T, Geserick P, Leverkus M and Meier P (2016) Techniques to Distinguish Apoptosis from Necroptosis *Cold Spring Harb Protoc* 2016(4): pdb.top 070375

**Fricker N**, Beaudouin J, Richter P, Eils R, Krammer PH and Lavrik IN (2010) Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of cFLIP<sub>L</sub>. *J Cell Biol* 190: 377-389

**Garbe C**, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, Pehamberger H, Eggermont AM; European Dermatology Forum (EDF); European Association of Dermato-Oncology (EADO) and European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (2016) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer* 63: 201-217

**Geserick P**, Drewniak C, Hupe M, Haas TL, Diessenbacher P, Sprick MR, Schön MP, Henkler F, Gollnick H, Walczak H and Leverkus M (2008) Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene* 27: 3211-3220

**Golks A**, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH and Lavrik IN (2005) cFLIP<sub>R</sub>, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 14507-14513

**Golks A**, Brenner D, Krammer PH and Lavrik IN (2006) The c-FLIP-NH<sub>2</sub> terminus (p22-FLIP) induces NF- $\kappa$ B activation. *J Exp Med* 203: 1295-1305

**Griffith TS**, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH and Kubin MZ (1998) Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161: 2833-2840

**Gurney B** and Newlands C (2014) Management of regional metastatic disease in head and neck cutaneous malignancy. 1. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 52: 294-300

- Harris J, Ibrahim H, Amen F, Karadimitris A, Naresh KN and Macdonald DH (2012)** Cellular (FLICE) like inhibitory protein (cFLIP) expression in diffuse large B-cell lymphoma identifies a poor prognostic subset, but fails to predict the molecular subtype. *Hematol Oncol* 30: 8-12
- Häcker G (2000)** The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 5-17
- Hengartner MO (2000)** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776
- Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA and Evers BM (2001)** Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg* 5: 56-65
- Hodak E, Jones RE, Ackerman AB (1993)** Solitary keratoacanthoma is a squamous-cell carcinoma: three examples with metastases. *Am J Dermatopathol* 15: 332-342; discussion 343-52.
- Hofmann K (1999)** The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* 55: 1113–1128
- Hu Y, Benedict MA, Ding L and Núñez G (1999)** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* 18: 3586-3595
- Hussein MR (2004)** Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* 57:797-801
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattman C, Rimoldi D, French LE and Tschopp J (1997)** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195
- Kamarajan P, Sun NK and Chao CC (2003)** Up-regulation of FLIP in cisplatin-selected HeLa cells causes cross-resistance to CD95/FAS death signalling. *Biochem J* 376: 253-260
- Kavuri SM, Geserick P, Berg D, Panayotova Dimitrova D, Feoktistova M, Siegmund D, Gollnick H, Neumann M, Wajant H and Leverkus M (2011)** Cellular FLICE-inhibitory Protein (cFLIP) Isoforms Block CD95- and TRAIL Death Receptor-induced

Gene Induction Irrespective of Processing of Caspase-8 or cFLIP in the Death-inducing Signaling Complex. *J of Biol Chem* 286: 16631-16646

**Kerr** JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257

**Korkolopoulou** P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E and Saetta AA (2004) c-FLIP expression in urothelial carcinomas: its role in resistance to FAS-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 63: 1198-1204

**Krueger** A, Baumann S, Krammer PH and Kirchhoff S (2001a) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21: 8247-8254

**Krueger** A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH and Kirchhoff S (2001b) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276: 20633-20640

**Kump** E, Ji J, Wernli M, Häusermann P and Erb P (2008) Gli2 upregulates cFlip and renders basal cell carcinoma cells resistant to death ligand-mediated apoptosis. *Oncogene* 27: 3856-3864

**Laemmli** UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

**Lavrik** IN and Krammer PH (2012) Regulation of CD 95/FAS signaling at the DISC. *Cell Death Differ* 19: 36-41

**Leiter** U and Garbe C (2008) Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 624: 89-103

**Leverkus** M, Sprick MR, Wachter T, Mengling T, Baumann B, Serfling E, Bröcker EB, Goebeler M, Neumann M and Walczak H (2003) Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol* 23: 770-790

- Leverkus M**, Diessenbacher P and Geserick P (2008) FLIP ing the coin? Death receptor mediated signals during skin tumorigenesis. *Exp Dermatol* 17: 614-622
- Li X**, Pan X, Zhang H, Lei D, Liu D, Xu F and Luan X (2008) Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 609-615.
- Locksley RM**, Killeen N and Lenardo JM (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501
- Lomas A**, Leonardi-Bee J and Bath-Hextall F (2012) A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 165: 1069-1080
- MacEwan DJ** (2002) TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135: 855-875
- Majno G** and Joris I (1995) Apoptosis, necrosis and oncosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15
- Martin SJ** and Green DR (1995) Protease Activation during apoptosis: Death by a Thousand Cuts? *Cell* 82: 349-352
- Mathas S**, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Jöhrens-Leder K, Vornlocher HP, Bommert K, Stein H and Dörken B (2004) c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 199: 1041-1052
- McIlwain DR**, Berger T and Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008656
- Medema JP**, de Jong J, van Hall T, Melief CJ and Offringa R (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190: 1033-1038
- Mori T**, Doi R, Toyoda E, Koizumi M, Ito D, Kami K, Kida A, Masui T, Kawauchi Y and Fujimoto K (2005) Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis as a new strategy for pancreatic cancer. *Surgery* 138: 71-77

- Nam SY, Juang GA, Hur GC, Chung HY, Kim WH, Seol DW and Lee BL (2003)** Up-regulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* 94: 1066-1073
- Neumann L, Pforr C, Beaudoin J, Pappa A, Fricker N, Krammer PH, Lavrik IN and Eils R (2010)** Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol* 6: 352
- Owen-Schaub LB, van Golen KL, Hill LL and Price JE (1998)** Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis. *J Exp Med* 188: 1717-1723
- Parone PA, James D and Martinou JC (2002)** Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105-111
- Peter ME and Krammer PH (2003)** The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*: 10: 26-35
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM and Meltzer PS (2003)** High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33: 19-20.
- Renault TT and Chipuk JE (2014)** Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis. *Chem Biol* 21: 114-123
- Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N and Katalinic A (2015)** Incidence trends of non-melanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges* 13: 778-797
- Safa AR (2012)** c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol* 34: 176-184
- Shitara D, Tell-Martí G, Badenas C, Enokihara MM, Alós L, Larque AB, Michalany N, Puig-Butille JA, Carrera C, Malveyh J, Puig S and Bagatin E (2015)** Mutational status of naevus-associated melanomas. *Br J Dermatol* 173: 671-680

- Salon C**, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C and Gazzeri S (2006) Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cell Death Differ* 13: 260-272
- Scaffidi C**, Kirchhoff S, Krammer PH and Peter ME (1999) Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11: 277-285
- Schulze-Osthoff K**, Ferrari D, Los M, Wesselborg S and Peter ME (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439–459.
- Shirley S** and Micheau O (2010) Targeting cFLIP in cancer. *Cancer Lett* 332: 141-150
- Strasser A**, Jost PJ and Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180-192
- Tarallo M**, Cigna E, Frati R, Delfino S, Innocenzi D, Fama U, Corbianco A und Scuderi N (2008) Metatypical basal cell carcinoma: a clinical review. *J Exp Clin Cancer Res* 27: 65
- Thome M**, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer J, Schröter M, Scaffidi C, Krammer P, Peter M and Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521
- Tsuchiya Y**, Nakabayashi O and Nakano H (2016) FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci* 16: 30321-30341
- Valente G**, Manfroi F, Peracchio C, Nicotra G, Castino R, Nicosia G, Kerim S and Isidoro C (2006) cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in non-Hodgkin lymphomas of low grade of malignancy. *Br J Haematol* 132: 560-570
- Valnet-Rabier MB**, Challier B, Thiebault S, Angonin R, Margueritte G, Mouglin C, Kantelip B, Deconinck E, Cahn JY and Fest T (2005) c-FLIP protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome. *Br J Haematol* 128: 767-773

**Van Houdt IS, Muris JJ, Hesselink AT, Kramer D, Cillessen SA, Moesbergen LM, Vos W, Hooijberg E, Meijer CJ, Kummer JA and Oudejans JJ (2007)** Expression of c-FLIP is primarily detected in diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma and correlates with lack of caspase 8 activation. *Histopathology* 51: 778-784

**Wachter T, Sprick M, Hausmann D, Kerstan A, McPherson K, Stassi G, Bröcker EB, Walczak H and Leverkus M (2004)** cFLIP<sub>L</sub> inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes. *J Biol Chem* 279: 52824-52834

**Wajant H (2003)** Targeting the FLICE Inhibitory Protein (FLIP) in cancer therapy. *Mol interv* 3: 124-127

**Wolf BB and Green DR (1999)** Suicidal Tendencies: Apoptotic cell death by Caspase Family Proteinases. *J Biol Chem* 274: 20049-20052

**Wu W, Liu P and Li J (2012)** Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 82: 249-258

**Xiao CW, Yan X, Li Y, Reddy SA and Tsang BK (2003)** Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor alpha is a consequence of nuclear factor kappaB-mediated induction of Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory protein. *Endocrinology* 144: 623-630

**Xue D, Shaham S and Horvitz HR (1996)** The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes dev* 10: 1073-1083

**Zaman S, Wang R and Gandhi V (2014)** Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 55: 1980-1992

**Zhang ZX, Jin TG, Yang H, DeWolf WC, Khosravi-Far R and Olumi AF (2004)** Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 64: 7086-7091

**Zimmermann** KC, Bonzon C and Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92: 57-70

**Zou** H, Li Y, Liu X and Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549–56



## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Caspase-Familie.....	2
Abbildung 2: Aufbau des DISC. ....	4
Abbildung 3: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges .....	7
Abbildung 4: Molekulare Struktur der cFLIP-Splicevarianten und von Caspase-8.....	8
Abbildung 5: Rolle von cFLIP bei Rezeptor-vermittelter Apoptose.....	10
Abbildung 6: NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	11
Abbildung 7: Western Blot Analyse der getesteten Antikörper .....	32
Abbildung 8: Immunhistochemie cFLIP. ....	33
Abbildung 9: cFLIP-Expression in epithelialen Tumoren .....	36
Abbildung 10: cFLIP-Expression in melanozytären Tumoren .....	38
Abbildung 11: Grafik cFLIP .....	41

Alle Abbildungen aus Publikationen werden mit Genehmigung des jeweiligen Verlages verwendet.

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	20
Tabelle 2: cFLIP-Expression in epithelialen Tumoren der Haut.....	35
Tabelle 3: cFLIP-Expression in melanozytären Tumoren.....	37
Tabelle 4: cFLIP-Expression im Primarius und zugehöriger Metastase .....	39

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit motiviert und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Kerstan für die Vergabe des Promotionsthemas, die Bereitstellung aller benötigten Materialien sowie die hochqualifizierte und umfassende Unterstützung und Motivation in den letzten Jahren, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Goebeler bedanken, der mit großem Interesse die wissenschaftliche Arbeit der Hautklinik Würzburg verfolgt und dessen fachliche und wissenschaftliche Expertise einen wertvollen Beitrag zur Erstellung meiner Promotionsarbeit lieferten.

Weiterhin danke ich Claudia Rüth und Margit Ott für die Einarbeitung in die notwendigen Labortechniken, die fachliche Unterstützung während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit und vor allem für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit im Laboralltag.

## 10 Lebenslauf

### Berufliche Laufbahn/Dissertation

Seit Januar 2017	<b>Ärztin in Weiterbildung</b> Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Würzburg
Seit Mai 2014	<b>Dissertation</b> <b>an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Würzburg</b> <b>(Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. A. Kerstan)</b> „Immunhistochemische Analysen zur Expression von cellular FLICE (FADD-like-IL-1 $\beta$ -converting-enzyme) - inhibitory protein (cFLIP) in epithelialen und melanozytären Tumoren der Haut“

### Schul- / Universitätsausbildung

April 2015	<b>Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung</b>
Februar 2012	<b>Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung</b>
Seit April 2010	<b>Julius-Maximilians-Universität Würzburg</b> Studium der Humanmedizin
2000 – 2009	<b>Maria-Ward-Gymnasium Bamberg</b> Allgemeine Hochschulreife
1996 – 2000	<b>Grundschule Zapfendorf</b>

Würzburg, 29.10.2019