

The species-specific role of caspase-8 as a regulator of necroptosis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Carina Saggau

Kiel

2018

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dieter Adam
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung:	11.12.2018
Zum Druck genehmigt:	11.12.2018

1. Summary

In contrast to apoptosis, the molecular mechanisms of the necroptotic signaling pathway remain to a certain proportion unknown. Since necroptosis is associated to various diseases, a precise knowledge of the necroptotic signaling pathway is essential for the development of new therapeutic strategies. The aim of this dissertation was to therefore gain a deeper insight into molecular and cellular events of TNF-induced necroptosis.

In the first part of the thesis, murine L929Ts cells deficient for caspase-8 as well as human HT-29 and U-937 cells deficient for caspase-8 or caspase-10 were generated by employing the CRISPR/Cas9 technology. It was shown that genetic ablation of caspase-8 in murine L929Ts cells enhances necroptosis (as shown in many studies worldwide for murine cells), whereas genetic ablation of caspase-8 in human U-937 and HT-29 cells protects the cells from TNF-induced necroptosis. The identification of those opposing effects of caspase-8 on necroptosis in mouse and man are essential for the attempt to develop new clinical strategies by targeting necroptosis through caspase-8. It is noteworthy that humans express caspase-8 and caspase-10, while caspase-10 was lost in mice over the course of evolution. In the presented dissertation, it was demonstrated that genetic ablation of caspase-10 in human cells exacerbates necroptosis, supporting the hypothesis that caspase-10 in humans can substitute the function that is held by caspase-8 in mice. Furthermore, experiments aimed at the identification of differences in the composition of necrosomes in wild type vs. caspase-8- or caspase-10-deficient U-937 and HT-29 cells found that caspase-10 associates with caspase-8 during TNF-induced necroptosis. Furthermore, genetic ablation of caspase-8 prevents the recruitment of caspase-10. Genetic ablation of caspase-8 disrupts the assembly of the necrosome while genetic ablation of caspase-10 promotes at least the recruitment of RIPK1 and RIPK3, which are core proteins of the necroptotic cell death machinery. The reconstitution of cells genetically deficient for caspase-8, with active and inactive forms of human and mouse caspase-8, confirmed a species-specific role of caspase-8 in the suppression of necroptosis. It was demonstrated that the reconstitution of human caspase-8-deficient HT-29 cells with active human caspase-8 enhances necroptosis, while reconstitution with active mouse caspase-8 does not enhance but rather protects the cells from TNF-induced necroptosis. Additionally, data obtained in this thesis revealed that the enzymatic activity of human and mouse caspase-8, as well as the enzymatic activity of caspase-10, are required for their function within the necroptotic signaling pathway. In summary, it can be stated that all data obtained in this thesis consistently point to a differential proteolytic regulation of necroptosis by caspase-8 in mice and in humans.

The serine protease HtrA2/Omi has been identified as a key mediator regulating TNF-induced necroptosis. Pharmacological inhibition or genetic deletion of HtrA2/Omi protects cells from necroptosis, but the underlying molecular mechanism is still unknown. In the second part of this thesis, several potential substrates (e.g., LONP1, PSA1, PMPCA, DBC1, PDXDC1 and VPS4B) of HtrA2/Omi were therefore analyzed by Western blot analysis and siRNA knockdown experiments. In the course of the work of this doctoral thesis, it was

discovered that one of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), named XIAP, is cleaved by HtrA2/Omi during necroptosis. Moreover, it was demonstrated that the effect caused by the genetic deletion of HtrA2/Omi could be neutralized upon usage of the IAP-deleting Smac mimetic birinapant, supporting the hypothesis that HtrA2/Omi mediates TNF-induced necroptosis by proteolytic cleavage of IAPs. In addition, by mass spectrometric analyses from mitochondrial fractions of necroptotic wild type and HtrA2/Omi-deficient mouse embryonic fibroblasts, 17 potential downstream mediators of HtrA2/Omi were identified.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zur Apoptose ist der molekulare Mechanismus des nekroptotischen Signalweges nur teilweise aufgeklärt. Da Nekroptose mit vielen verschiedenen Krankheiten in Verbindung steht, ist es essentiell, genaue Erkenntnis über den Signalweg der Nekroptose zu erlangen, um neue therapeutische Strategien entwickeln zu können. Daher war das Ziel der vorliegenden Dissertation, einen tieferen Einblick in molekulare und zelluläre Prozesse der TNF-induzierten Nekroptose zu gewinnen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden sowohl Caspase-8-defiziente L929Ts Mauszellen als auch Caspase-8- oder Caspase-10-defiziente humane HT-29 und U-937 Zellen mittels CRISPR/Cas9 Technologie generiert. Es wurde gezeigt, dass genetische Deletion von Caspase-8 in L929Ts Mauszellen Nekroptose verstärkt (wie auch bereits in vielen Studien in Mauszellen weltweit gezeigt), wohingegen genetische Deletion von Caspase-8 in humanen U-937 und HT-29 Zellen die Zellen vor TNF-induzierter Nekroptose schützt. Die Identifikation dieser gegensätzlichen Effekte von Caspase-8 auf Nekroptose in Mäusen und im Menschen ist entscheidend für die Entwicklung neuer klinischer Strategien, wenn man versucht Nekroptose über Caspase-8 zu manipulieren. Nennenswert an dieser Stelle ist, dass der Mensch Caspase-8 und Caspase-10 exprimiert, während Caspase-10 in Mäusen im Verlauf der Evolution verloren gegangen ist. In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass genetische Deletion von Caspase-10 in humanen Zellen Nekroptose begünstigt, was die Hypothese unterstützt, dass Caspase-10 im Menschen die Funktion, welche der Caspase-8 in Mäusen zugeschrieben ist, übernimmt. Des Weiteren haben Experimente mit dem Ziel zur Identifikation von Unterschieden in der Komposition des „Nekrosoms“ von Wildtyp vs. Caspase-8-defizienten U-937 und HT-29 Zellen ergeben, dass Caspase-10 und Caspase-8 während TNF-induzierter Nekroptose assoziieren und dass die genetische Deletion von Caspase-8 die Rekrutierung von Caspase-10 verhindert. Die genetische Deletion von Caspase-8 stört die Bildung des „Nekrosoms“, während die genetische Deletion von Caspase-10 zumindest die Rekrutierung von RIPK1 und RIPK3 begünstigt, welche Hauptkomponenten des nekroptotischen Zelltodes sind. Die Rekonstitution von Caspase-8-defizienten Zellen mit aktiven und inaktiven Formen von humaner und muriner Caspase-8 bestätigte eine spezies-spezifische Rolle der Caspase-8 in Bezug auf ihre unterdrückende Funktion auf Nekroptose. Es wurde demonstriert, dass die Rekonstitution von humanen Caspase-8-defizienten HT-29 Zellen mit humaner Caspase-8 Nekroptose verstärkt, während die Rekonstitution mit

muriner Caspase-8 Nekroptose vermindert. Außerdem ergaben die innerhalb dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass die enzymatische Aktivität von Caspase-8 und -10 essentiell für ihre Funktion innerhalb des nekroptotischen Signalweges ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Daten, welche innerhalb der vorliegenden Arbeit generiert wurden, übereinstimmend auf einen Unterschied in der proteolytischen Regulation der Nekroptose durch Caspase-8 in der Maus und im Menschen hindeuten.

Die Serinprotease HtrA2/Omi wurde als Schlüsselmediator identifiziert, welche die TNF-induzierte Nekroptose reguliert. Pharmakologische Inhibition oder genetische Deletion von HtrA2/Omi schützen Zellen vor Nekroptose, aber der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang unbekannt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher verschiedene potentielle Substrate (z.B. LONP1, PSA1, PMPCA, DBC1, PDXDC1 und VPS4B) der Serinprotease HtrA2/Omi mittels Western Blot Analyse und „siRNA-Knockdown“ Experimenten untersucht. Im Verlauf der vorliegenden Dissertation wurde herausgefunden, dass einer der Apoptose-Inhibitoren (IAPs) mit dem Namen XIAP während der Nekroptose von HtrA2/Omi gespalten wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Effekt, welcher durch die genetische Deletion von HtrA2/Omi hervorgerufen wurde, durch den Einsatz des IAP-abbauenden Smac-Mimetikums Birinapant aufgehoben werden konnte, was die Hypothese unterstützt, dass HtrA2/Omi die TNF-induzierte Nekroptose durch die proteolytische Spaltung der IAPs reguliert. Zusätzlich wurden durch massenspektrometrische Analysen mitochondrialer Fraktionen, welche aus nekroptotischen Wildtyp und HtrA2/Omi-defizienten embryonalen Mausfibroblasten gewonnen wurden, 17 neue potentielle Substrate „Downstream“ von HtrA2/Omi identifiziert.