

# Ubiquitin ligase activity of XIAP in cellular inflammatory response

Pia Nora Broxtermann

## Abstract

The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is the best-studied member of the IAP protein family. As the only known cellular protein that can directly bind to and inhibit caspases, XIAP has been identified to contribute to the regulation of apoptosis. Moreover, XIAP harbours an E3 ubiquitin ligase activity.

Dysregulation of apoptosis is one of the hallmarks of cancer. In many human cancer entities, elevated expression XIAP was observed and due to the cytoprotective property it has been investigated as a promising therapeutic target in cancer. However, the molecular mechanisms giving rise to the elevated XIAP protein expression in malignant cells are still poorly characterised. The consequences of enhanced XIAP levels in human cancer cells are also not well understood, and appear to affect mechanisms beyond the increased inhibition of apoptosis.

To study the consequences of enhanced XIAP expression we overexpressed XIAP constructs with deletion of whole domains or point mutations within domains. We found highly expressed XIAP to form cytoplasmic complexes both in tumour tissues and upon ectopic expression of GFP-XIAP. In these protein complexes XIAP is strongly ubiquitinated, but complex formation is independent from the ubiquitination state of XIAP. Furthermore, the formation of cytoplasmic XIAP complexes, subsequent XIAP ubiquitin ligase activation and auto-ubiquitination was dependent on dimerisation of XIAP, mediated by the RING domain.

Recent studies elucidated the influence of IAPs on signalling pathways, including NF- $\kappa$ B, that modulate immune signalling. XIAP was found to be an essential component of the NOD signalling cascade, required for the activation of NF- $\kappa$ B mediated inflammatory responses upon bacterial infection.

We demonstrated that elevated XIAP levels alone are sufficient to activate NF- $\kappa$ B signalling in an ubiquitin ligase dependent manner. In particular, XIAP binds to RIPK2 via its BIR2 domain and ubiquitinate RIPK2, resulting in NF- $\kappa$ B signalling and up-regulation of IL-8 expression and secretion. Furthermore, our data provide the first evidence for a possible pro-inflammatory role of XIAP in melanoma tissues.

To study the physiological relevance and consequence of elevated XIAP levels a new conditional mouse model overexpressing HA-mXIAP was generated. Preliminary results from two mice with highly inflamed uteri indicate a pro-inflammatory role of mXIAP in this mouse model.

Taken together, our data show that XIAP dimerisation regulates XIAP ubiquitin ligase activity and thereby controls the abundance of itself and impacts on cellular signalling machineries involving XIAP. In particular, elevated XIAP expression impacts on IL-8 secretion by ubiquitination of RIPK2. Thereby, enhanced XIAP expression might contribute to an inflammatory cancer microenvironment. This knowledge provides a new approach for targeting XIAP ligase activity in cancer therapy to manipulate the tumour microenvironment.

## Zusammenfassung

XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) ist das am besten untersuchte Mitglied der humanen IAP-Proteinfamilie. XIAP kann als einziges bekanntes zelluläres Protein direkt an Caspasen binden und diese inhibieren. Darüberhinaus kann es als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren.

In der Vergangenheit wurde in vielen Arbeiten die Rolle von XIAP in Krebserkrankungen untersucht, da zum einen eine erhöhte Expression von XIAP in vielen Tumoren beschrieben wurde und XIAP zum anderen die Fähigkeit besitzt Caspasen und somit Apoptose zu blockieren. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde XIAP als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von Krebs angesehen.

Obwohl die erhöhte Expression von XIAP wiederholt in verschiedenen Tumoren gezeigt wurde, sind die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen nur dürftig beschrieben. Auch die Konsequenzen der erhöhten XIAP Expression und die daraus resultierenden physiologischen Auswirkungen sind nicht gut erforscht und scheinen diversere Auswirkungen zu haben als ausschließlich verstärkte Apoptoseinhibition.

Um dies näher zu untersuchen wurden zunächst Deletions- und Punktmutationskonstrukte von XIAP generiert und überexprimiert. Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben, dass XIAP sowohl nach ektopischer Expression von GFP-XIAP, als auch bei erhöhter Expression von endogenem XIAP in Tumorgewebe cytoplasmatische Komplexe bildet. Obwohl XIAP in diesen Komplexen strukturell ubiquitiniert vorliegt, ist die Komplexbildung unabhängig von der XIAP Ubiquitinierung. Dahingegen ist die Komplexbildung abhängig von der Dimerisierung der RING Domäne, was auch zur Aktivierung der Ubiquitin-Ligase und somit zur Autoubiquitinierung führt.

Neuere Studien zeigen das IAP-Proteine auch Signalwege beeinflussen die Immunantworten regulieren, wie z.B. den NF- $\kappa$ B Signalweg. Für XIAP im speziellen wurde gezeigt, dass es

eine entscheidende Komponente im NOD Signalweg darstellt und zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges nach bakterieller Infektion benötigt wird.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die erhöhte Expression von XIAP und die damit verbundene Aktivierung der Ubiquitin-Ligase Funktion ausreichend ist, um den NF- $\kappa$ B Signalweg zu aktivieren. Hierzu bindet XIAP über die BIR2 Domäne an RIPK2. Diese Bindung wird für die durch XIAP vermittelte Ubiquitinierung von RIPK2 benötigt, welche wiederum essentiell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges ist. Durch NF- $\kappa$ B wird in die Expression von IL-8 angeregt, was zur vermehrter Sekretion von IL-8 führt. Darüber hinaus konnte zum ersten mal ein möglicher proinflammatorischer Effekt von erhöhter XIAP Expression in Melanomgeweben nachgewiesen werden.

Um die Auswirkung der Überexpression von XIAP *in vivo* studieren zu können, wurde eine konditionale HA-mXIAP überexprimierende Mauslinie generiert. Die vorläufigen Ergebnisse von zwei Mäusen mit stark entzündeten Uteri lassen vermuten, dass auch die erhöhte Expression von mXIAP einen proinflammatorischen Effekt ausübt.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie, dass die Ubiquitin-Ligase Funktion von XIAP über die Dimerisierung der RING Domäne gesteuert wird. Dadurch wird sowohl die Protein Abundanz von XIAP selbst, als auch die durch XIAP gesteuerten Prozesse in zellulären Signalwegen reguliert. Die erhöhte XIAP Expression verstärkt die Sekretion von IL-8 und beeinflusst dadurch möglicherweise das Tumormikromilieu. Demzufolge stellt die Ubiquitin-Ligase Funktion von XIAP eventuell einen neuen therapeutischen Ansatz für die Krebs Therapie dar, um dadurch das Tumormikromilieu zu beeinflussen.