

The Role of RIPK1 ubiquitination during inflammatory and cell death signaling

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Matthias Frederic Kist
aus Horb am Neckar

San Francisco/Köln 2021

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung

Die Rezeptor-interagierende Proteinkinase 1 (RIPK1) spielt eine zentrale Rolle im Tumornekrosefaktor (TNF) induzierten Signalweg und fungiert als wichtige strukturelle Komponente innerhalb des TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) Komplexes. Als Teil des Komplex II moduliert RIPK1 Apoptose und Nekroptose mittels ihrer Kinaseaktivität. Während dieser Prozesse wird RIPK1 durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung modifiziert. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von RIPK1-Ubiquitinierung während der Signaltransduktion mittels genetischer Mausmodelle.

Zwei Lysine (K), K115 und K377, wurden bereits in menschlichen Zellen als wichtige Ubiquitinakzeptoren für NF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) Aktivierung, sowie Nekroptose identifiziert. Mittels CRISPR/Cas9 wurden zwei Knock-in Mäuse generiert, welche jeweils einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin besitzen - K115R und - K376R - und somit nicht mehr an diesen Positionen ubiquitiniert werden können.

Ripk1^{K115R/K115R} Mäuse zeigten keinen Entwicklungsphänotyp, waren jedoch empfindlicher im TNF induzierten SIRS-Modell (systemic inflammatory response syndrome). Knock-in Primärzellen waren empfindlicher gegenüber TNF induzierter Nekroptose, wohingegen sich kein Defekt bei NF- κ B oder MAPK Signalwegen zeigte.

Ripk1^{K376R/K376R} Embryonen starben mit Merkmalen für Apoptose und Nekroptose.

Tnfr1^{-/-} Ripk1^{K376R/K376R} Mäuse überlebten länger, starben allerdings einige Tage nach der Geburt mit Anzeichen einer systemischen Entzündung. *Ripk1^{K376R/K376R} Casp8^{-/-}*

Ripk3^{-/-} Mäuse erreichten Erwachsenenalter. Ein induzierbares Mausmodell wurde durch die Kombination eines konditionellen RIPK1 Knock-out (cko) Allels mit dem *Ripk1^{K376R}* Allel erzeugt. Erwachsene Mäuse (*Ripk1^{K376R/cko}*) waren extrem empfindlich im TNF induzierten SIRS. Primäre Knock-in Zellen zeigten einen Defekt bei der Rekrutierung von Komponenten des TNFR1-Komplexes sowie eine reduzierte Aktivierung von NF- κ B. Außerdem wurde RIPK1-K376R weniger mit verschiedenen Ubiquitinketten modifiziert und Knock-in Zellen zeigten sich empfindlicher für TNF induzierten Zelltod. Zusammenfassend hat diese Arbeit die zentrale Rolle der RIPK1-Ubiquitinierung im TNFR1-Komplex für die NF- κ B Aktivierung und die Regulierung des programmierten Zelltodes gezeigt. Des Weiteren lassen die Daten vermuten, dass das Potential von RIPK1 Zelltod zu induzieren durch Modifikationen in diesem Komplex reguliert wird.

SUMMARY

Summary

The receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1) is critical for proper tumor necrosis factor (TNF) signaling. For inflammatory signaling, RIPK1 is an important scaffolding factor within the TNF receptor (TNFR1) complex. In complex II, RIPK1 modulates apoptosis and necroptosis, mostly through its kinase activity. These signaling events involve post-translational modifications of RIPK1 by phosphorylation and ubiquitination. The aim of this study was to further characterize the role of RIPK1 ubiquitination during signaling by using genetic mouse models.

Two lysine (K) residues, K115 and K377, had previously been identified in human cells as critical sites for ubiquitination during nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, and necroptosis. Using CRISPR/Cas9 technology, two knock-in mice were generated carrying lysine to arginine mutations in RIPK1 preventing ubiquitination at those sites: K115R and K376R.

Ripk1^{K115R/K115R} mice did not show any developmental phenotype, but were mildly sensitized in TNF induced systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Similarly, *Ripk1*^{K115R/K115R} primary cells were more sensitive to TNF induced necroptosis, whereas they did not show any defects in NF- κ B or MAPK signaling.

RIPK1-K376R homozygosity, however, caused embryonic lethality with apoptotic and necroptotic cell death detectable. Survival of *Tnfr1*^{-/-} *Ripk1*^{K376R/K376R} mice was prolonged, but pups died shortly after birth with signs of systemic inflammation.

Ripk1^{K376R/K376R} mice lacking caspase-8 and RIPK3 reached adulthood. An inducible mouse model was generated by combining a conditional RIPK1 knock-out (cko) allele with *Ripk1*^{K376R/+}. Adult mice that expressed only one copy of mutated RIPK1 (*Ripk1*^{K376R/cko}) were extremely sensitive in TNF-induced SIRS. *In vitro*, primary knock-in cells showed defects in the recruitment of TNFR1 complex components and decreased NF- κ B signaling. In addition, RIPK1 modifications by different ubiquitin chains was reduced and knock-in cells were sensitized to TNF induced cell death.

In conclusion, this study illuminated the critical role of RIPK1 ubiquitination in the TNF receptor complex for proper NF- κ B function as well as for the regulation of cell death signaling. These data suggest that the cell death inducing potential of RIPK1 is regulated by modifications within this complex.