

Abstract

Cell death and inflammatory signalling are tightly regulated and interconnected cellular processes. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) were primarily described as inhibitors of apoptosis *via* direct binding to caspases. Accumulating evidence showed however that IAPs control cellular death and inflammatory signalling by acting as ubiquitin ligases. Cellular IAP1 and cellular IAP2 (cIAP1 and cIAP2) are crucial mediators of TNF-induced canonical and non-canonical NF- κ B activation by ubiquitylating receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1) and NF- κ B-inducing kinase (NIK). X-linked IAP (XIAP) represents the only known direct inhibitor of caspase-3/-7 and -9, while also regulating inflammatory cascades *via* its E3 ligase activity and ubiquitylation of RIPK2. Thus, IAPs act at the crossroads of both, cell death and inflammation.

Despite their important functions in the regulation of cellular death and survival, mice lacking either cIAP1, cIAP2 or XIAP are essentially normal, raising the possibility that IAPs have redundant, or at least partially overlapping functions. Combined deletion of *clap1* and *clap2* or *clap1* and *Xiap* however caused embryonic lethality at E10.5, which was associated with cardio-vascular defects. Further ablation of *Tnfr1* could only prolong embryonic development to birth but failed to restore viability. These observations suggested that IAPs may control cell death and inflammatory signalling in different tissues during embryonic development, presumably by interfering with different signalling moieties.

This study shows that combined endothelial cell-specific deletion of *clap1* and *clap2* (cIAP1^{EC-/-} cIAP2^{-/-}) or *clap1* and *Xiap* (cIAP1^{-/-} XIAP^{EC-/-}) caused embryonic lethality at E10.5 identifying the endothelium as one of the tissues depending on IAP function. The developmental arrest was rescued beyond weaning by additional EC-specific deletion of *Tnfr1* indicating that IAPs control TNF α -induced endothelial cell death and mortality during embryonic development. *In vitro* analyses using isolated primary cIAP1 cIAP2 DKO as well as cIAP1 XIAP DKO ECs showed that TNF α -mediated endothelial cell death can be blocked either by additional deletion of *Tnfr1* or pharmacological inhibition of RIPK1-kinase activity. These data indicate that XIAP efficiently contributes to the control of TNF α -mediated RIPK1-driven cytotoxicity in ECs.

Zusammenfassung

Zelltod und Entzündungssignale sind streng regulierte und miteinander verknüpfte zelluläre Prozesse. Inhibitors of apoptosis proteins (IAP) wurden als Inhibitoren der Apoptose durch direkte Bindung an Caspasen beschrieben. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass IAPs Zelltod und Entzündungssignale kontrollieren, indem sie als Ubiquitin-Ligasen wirken. cellular IAP1 und cellular IAP2 (cIAP1 und cIAP2) sind Vermittler der kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Aktivierung, indem sie receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1) und NF- κ B-inducing kinase (NIK) regulieren. X-linked IAP (XIAP) ist der einzige bekannte direkte Inhibitor von Caspase-3/-7 und -9 und reguliert gleichzeitig Entzündungskaskaden über seine E3-Ligase-Aktivität und die Ubiquitylierung von RIPK2. IAPs agieren somit an der Schnittstelle zwischen Zelltod und Entzündung. Mäuse denen entweder cIAP1, cIAP2 oder XIAP fehlt sind im Wesentlichen normal, was die Möglichkeit aufwirft, dass IAPs redundante oder zumindest teilweise überlappende Funktionen haben. Die kombinierte Deletion von *clap1* und *clap2* oder *clap1* und *Xiap* führte jedoch zu einer embryonalen Letalität bei E10.5, die mit kardio-vaskulären Defekten einherging. Eine weitere Ablation von *Tnfr1* konnte nur die Embryonalentwicklung bis zur Geburt verlängern, die Lebensfähigkeit allerdings nicht wiederherstellen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass IAPs den Zelltod und die Entzündungssignale in verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung kontrollieren können, vermutlich durch Interferenz mit verschiedenen Signaleinheiten. Diese Studie zeigt, dass die kombinierte endothelzell (EC)-spezifische Deletion von *clap1* und *clap2* (cIAP1^{EC-/-} cIAP2^{-/-}) oder von *clap1* und *Xiap* (cIAP1^{-/-} XIAP^{EC-/-}) zu einer embryonalen Letalität bei E10.5 führt und identifiziert das Endothel als eines der Gewebe, welches von der Funktion der IAPs abhängig ist. Der Entwicklungsstillstand konnte durch zusätzliche EC-spezifische Deletion von *Tnfr1* gerettet werden, was darauf hindeutet, dass IAPs den TNF-induzierten Endothelzelltod und die Mortalität während der Embryonalentwicklung kontrollieren. *In vitro* Analysen isolierter primärer cIAP1 cIAP2 DKO sowie cIAP1 XIAP DKO ECs zeigen, dass der TNF mediierte Zelltod durch eine Deletion von *Tnfr1* oder pharmakologische Hemmung der RIPK1-Kinase-Aktivität blockiert werden kann. Diese Daten weisen darauf hin, dass XIAP effizient zur Kontrolle der TNF-vermittelten RIPK1-abhängigen Zytotoxizität in ECs beiträgt.