

Mechanisms of caspase-8 and cFLIP interactions in cell death regulation

Doctoral dissertation by Neil Stair at the University of Cologne awarded September 6 2023

Abstract

Caspase-8 is a crucial regulator of extrinsic cell death, performing a dual function as an initiator of apoptosis and inhibitor of necroptosis. Homodimerization of caspase-8 induces autoproteolytic cleavage, activation and initiation of apoptotic cell death. On the other hand, the cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) modulates caspase-8 activity by inhibiting its complete activation and is thought to be the key determinant in cell fate downstream of multiple death receptors. Numerous biochemical studies have examined how caspase-8 and cFLIP interact to regulate caspase-8 activity. These studies have pervaded the concept that oligomerization of caspase-8 induces apoptosis while heterodimerization with cFLIP enables partial activation, which is crucial for necroptosis inhibition. However, the physiological relevance of these mechanisms has not been thoroughly investigated. In this study, we sought to elucidate the role of caspase-8 activation *in vivo* by specifically inhibiting caspase-8 oligomerization or cFLIP-mediated caspase-8 activation. To this end, we generated mice harboring a mutation in the second death effector domain (DED2) of caspase-8 (*Casp8^{mDED2/mDED2}*) to inhibit its oligomerization and apoptotic potential or a mutation in the glutamine (Q) 469 to aspartic acid (D) of cFLIP (*cFlip^{Q469D/Q469D}*) to inhibit cFLIP-mediated activation of caspase-8. We show that the caspase-8 DED2 mutation suppresses caspase-8 activation *in vitro* and fully prevents cell death-dependent inflammation and hepatocellular carcinoma in a mouse model of chronic liver disease. Strikingly, *in vitro* analyses demonstrated that inhibition of caspase-8 oligomerization also triggered MLKL-dependent necroptosis downstream of multiple death receptors, suggesting caspase-8 oligomerization contributes to necroptosis inhibition. Indeed, the caspase-8 DED2 mutation blocked apoptosis- but induced necroptosis-dependent skin lesion development in a mouse model of chronic dermatitis. In line with this observation, mutation of the cFLIP Q469D was not sufficient to induce embryonic lethality, but did sensitize cells to necroptosis upon activation of various death receptors. By combining both caspase-8 DED2 and cFLIP Q469D mutations, we completely abrogated caspase-8 activation, resulting in embryonic lethality which could be rescued to the perinatal stage by necroptosis inhibition. Together, we demonstrate a novel function of caspase-8 oligomerization in necroptosis inhibition and confirm the mechanism of cFLIP-mediated caspase-8 activation as a negative regulator of necroptosis *in vivo*.

Zusammenfassung

Caspase-8 ist ein entscheidender Regulator des extrinsischen Zelltods und erfüllt eine Doppelfunktion als Initiator der Apoptose und Inhibitor der Nekroptose. Die Homodimerisierung von Caspase-8 induziert autoproteolytische Spaltung, Aktivierung und Einleitung des apoptotischen Zelltods. Auf der anderen Seite moduliert das zelluläre FLICE-ähnliche Inhibitorprotein (cellular FLICE-like inhibitory protein; cFLIP) die Aktivität von Caspase-8, indem es die vollständige Aktivierung hemmt, und gilt als der entscheidende Faktor für das Zellschicksal stromabwärts mehrerer Todesrezeptoren. Zahlreiche biochemische Studien haben untersucht, wie Caspase-8 und cFLIP interagieren, um die Caspase-8-Aktivität zu regulieren. Diese Studien haben das Konzept etabliert, dass die Oligomerisierung von Caspase-8 Apoptose induziert, während die Heterodimerisierung mit cFLIP eine teilweise Aktivierung ermöglicht, die für die Hemmung der Nekroptose entscheidend ist. Die physiologische Relevanz dieser Mechanismen wurde jedoch bisher nicht gründlich untersucht. In dieser Studie wollten wir die Rolle der Caspase-8-Aktivierung *in vivo* aufklären, indem wir gezielt die Caspase-8-Oligomerisierung oder die cFLIP-vermittelte Caspase-8-Aktivierung hemmen. Zu diesem Zweck haben wir Mäuse generiert, die eine Mutation in der zweiten Todeseffektordomäne (DED2) von Caspase-8 (*Casp8^{mDED2/mDED2}*) aufweisen, um deren Oligomerisierung und apoptotisches Potenzial zu hemmen, oder eine Mutation von Glutamin (Q) 469 zu Asparaginsäure (D) von cFLIP (*cFlip^{Q469D/Q469D}*), um die cFLIP-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 zu hemmen. Wir zeigen, dass die Caspase-8-DED2-Mutation die Caspase-8-Aktivierung *in vitro* unterdrückt und zelltodabhängige Entzündungen und hepatozelluläres Karzinom in einem Mausmodell für chronische Lebererkrankungen vollständig verhindert. Erstaunlicherweise zeigten *in-vitro*-Analysen, dass die Hemmung der Caspase-8-Oligomerisierung auch eine MLKL-abhängige Nekroptose stromabwärts mehrerer Todesrezeptoren auslöste, was darauf schließen lässt, dass die Caspase-8-Oligomerisierung zur Hemmung der Nekroptose beiträgt. Tatsächlich blockierte die Caspase-8-DED2-Mutation die Apoptose, induzierte aber eine nekroptoseabhängige Entwicklung von Hautläsionen in einem Mausmodell für chronische Dermatitis. Im Einklang mit dieser Beobachtung reichte die Mutation von cFLIP Q469D nicht aus, um embryonale Letalität auszulösen, sensibilisierte aber Zellen für Nekroptose bei Aktivierung verschiedener Todesrezeptoren. Durch die Kombination der Mutationen von Caspase-8 DED2 und cFLIP Q469D konnten wir die Caspase-8-Aktivierung vollständig aufheben, was zu embryonaler Letalität führte, welche durch Hemmung der Nekroptose bis ins perinatale Stadium gerettet werden konnte. Zusammen zeigen wir eine neue Funktion der Caspase-8-Oligomerisierung bei der Hemmung der Nekroptose und bestätigen den

Mechanismus der cFLIP-vermittelten Caspase-8-Aktivierung als negativen Regulator der Nekroptose in vivo.