

# *In vivo* function of FADD and Caspase-8 in the intestinal epithelium

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



vorgelegt von  
Robin Schwarzer  
aus Langenfeld

Köln, 2019

## Zusammenfassung

Das intestinale Epithel bildet eine strukturelle und immunologische Barriere, welche essentiell für die Immunhomöostase des Darms ist. Eine beeinträchtigte Integrität der Darmbarrierefunktion kann zu intestinalen Entzündungen führen und wird mit der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht. Daher sind die Mechanismen, die das Überleben und den Tod von Darmepithelzellen sicherstellen, wichtig, um Darmentzündungen zu verhindern. FADD ist ein Adapterprotein, das maßgeblich an der Aktivierung von Caspase-8 und der Induktion von Rezeptor-vermittelter Apoptose beteiligt ist. Zusätzlich verhindert Caspase-8 die Aktivierung von Nekroptose. Nekroptose ist ein programmierter nekrotischer Zelltod, der durch die Phosphorylierung der Pseudokinase MLKL durch RIPK3 induziert wird. Bisherige Studien zeigten, dass die intestinale Epithelzellen (IEZ)-spezifische Deletion von FADD (FADD<sup>IEZ-KO</sup>) in Mäusen zu spontaner RIPK3-abhängiger Ileitis und Colitis führt. Im Gegensatz dazu führte die IEZ-spezifische Deletion von Caspase-8 (CASP8<sup>IEZ-KO</sup>) zu RIPK3-abhängiger Ileitis ohne gleichzeitige Colitis. Diese Befunde legen nahe, dass FADD und Caspase-8 unterschiedliche Aufgaben im Darm wahrnehmen. Das Ziel der hier vorlegten Studie war es, die unterschiedlichen Funktionen von FADD und Caspase-8 im Darmepithel zu entschlüsseln. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl FADD<sup>IEZ-KO</sup>- als auch CASP8<sup>IEZ-KO</sup>-Mäuse spontane Ileitis und Colitis entwickeln. Die zusätzliche Deletion von MLKL (*Mlkl*<sup>-/-</sup>) verhinderte die spontane Colitis in der Abwesenheit von FADD oder Caspase-8, wohingegen die spontane Ileitis nur in CASP8<sup>IEZ-KO</sup> Mäusen, jedoch nicht in FADD<sup>IEZ-KO</sup> Mäusen, verhindert wurde. Die zusätzliche IEZ-spezifische Deletion von Caspase-8 in FADD<sup>IEZ-KO</sup> *Mlkl*<sup>-/-</sup> Mäusen verhinderte die Ileitis. Diese Ergebnisse identifizieren FADD als negativen Regulator von Caspase-8-abhängigen Gewebsentzündungen. Weiterhin wurde die RIPK3 abhängige Colitis in FADD<sup>IEZ-KO</sup>-Mäusen durch die RHIM-Domänen enthaltenden Proteine RIPK1 und ZBP1 vermittelt. Zusammenfassend offenbaren die vorgelegten Ergebnisse in dieser Arbeit bisher unbekannt Funktionen von FADD und Caspase-8, welche maßgeblich an der Immunhomöostase und der Verhinderung von Darmentzündungen beteiligt sind.

## Abstract

The intestinal epithelium forms a structural and immunological barrier that is critical for the maintenance of immune homeostasis in the gut. Impairment of epithelial barrier integrity can result in intestinal inflammation and is implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD). Therefore, mechanisms controlling the survival and death of intestinal epithelial cells play an important role in preventing inflammation. FADD is an adapter protein that is essential for Caspase-8 activation and the induction of death receptor-mediated apoptosis. Caspase-8 also prevents the activation of necroptosis, a type of regulated necrotic cell death induced by RIPK3-mediated phosphorylation and activation of the necroptosis executing pseudokinase MLKL. Previous studies showed that mice with intestinal epithelial cell (IEC) specific deletion of FADD (FADD<sup>IEC-KO</sup>) developed ileitis and colitis that depended on RIPK3, suggesting that necroptosis of FADD-deficient IECs causes intestinal pathology in FADD<sup>IEC-KO</sup> mice. However, mice with epithelial specific Caspase-8 knockout (CASP8<sup>IEC-KO</sup>) were reported to develop RIPK3-dependent ileitis but did not develop colitis suggesting differential functions of FADD and Caspase-8 in the intestine. The aim of this thesis was to dissect the differential functions of FADD and Caspase-8 in the intestinal epithelium and elucidate the underlying mechanisms. The results obtained revealed that both FADD<sup>IEC-KO</sup> and CASP8<sup>IEC-KO</sup> mice develop ileitis and colitis. However, MLKL deficiency prevented colitis but did not fully prevent ileitis in FADD<sup>IEC-KO</sup> mice, suggesting that necroptosis-independent mechanisms contribute to ileitis development in these mice. In contrast, MLKL deficiency fully prevented both ileitis and colitis in CASP8<sup>IEC-KO</sup> mice showing that necroptosis causes the intestinal pathology in the absence of Caspase-8. Surprisingly, additional epithelial specific knockout of Caspase-8 prevented ileitis development in FADD<sup>IEC-KO</sup> *Mkl1*<sup>-/-</sup> mice, revealing a new role of FADD as a negative regulator of Caspase-8 dependent tissue inflammation. Dissection of the upstream pathways regulating intestinal inflammation revealed that two proteins that contain RIP homotypic interaction motifs, namely RIPK1 and ZBP1, both contribute to RIPK3-mediated development of colitis in FADD<sup>IEC-KO</sup> mice. Taken together, the data presented in this thesis revealed previously unknown functions of FADD and Caspase-8 that are important for the regulation of immune homeostasis and the prevention of inflammation in the intestine.