

ETH-Diss.-No 17640

# **The Inflammasome: A Key Regulator of Unconventional Protein Secretion**

A dissertation submitted to the

**ETH ZURICH**

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**MARTIN KELLER**

Dipl. Natw. ETH Zurich, Switzerland

born August 8, 1977

citizen of Kirchberg (SG), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner

Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

Dr. Hans-Dietmar Beer, co-examiner

2008

---

## Zusammenfassung

Zellen von Säugetieren exportieren die meisten Proteine über das Endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat. Dennoch werden einige Proteine über andere, unkonventionelle Wege sekretiert. Zu diesen Proteinen gehören zum Beispiel die proinflammatorischen Zytokine Interleukin(IL)-1, IL-18 und IL-33, welche durch Caspase-1 geschnitten werden müssen, um ihre biologische Aktivität entfalten zu können. Caspase-1 selbst wird durch die Inflammasome aktiviert. Dies sind angeborene Immunitätskomplexe, welche ursprünglich in Makrophagen identifiziert wurden. Die Mechanismen, die der unkonventionellen Proteinsekretion zugrunde liegen, waren bis jetzt weitgehend unbekannt. In dieser Doktorarbeit untersuchte ich die Rolle von Caspase-1, des Inflammasoms und des Caspase-1 Bindungsproteins *estrogen-responsive B box protein* (EBBP) bei der unkonventionellen Sekretion von IL-1 und anderen Proteinen.

Im Hauptteil meiner Doktorarbeit untersuchte ich eine mögliche Funktion von Caspase-1 bei der Regulation von unkonventioneller Proteinsekretion. Es war bereits bekannt, dass Makrophagen von Caspase-1 Knockout-Mäusen nicht nur weniger IL-1 $\beta$  sezernieren, sondern auch weniger des zu IL-1 $\beta$  funktionell analogen IL-1 $\alpha$ . Dies ist erstaunlich, da Letzteres kein Substrat von Caspase-1 ist und auch nicht durch Caspase-1 geschnitten werden muss, um an seinen Rezeptor zu binden. Daher fragten wir uns, ob Caspase-1 Aktivität generell für unkonventionelle Proteinsekretion benötigt wird. Ich konnte zeigen, dass die Freisetzung der Signalpeptid-freien Proteine ProIL-1 $\alpha$ , Caspase-1 und *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) von Caspase-1-Aktivität abhängt. Obwohl ProIL-1 $\alpha$  und FGF-2 keine Substrate dieser Protease sind, interagieren sie physisch mit Caspase-1. Sekretom-Analyse unter Verwendung von iTRAQ Proteomik zeigte die Caspase-1-vermittelte Sezernierung von zusätzlichen Signalpeptid-freien Proteinen mit bekannten und unbekanntem extrazellulären Funktionen. Es war auffallend, dass viele dieser Proteine in Entzündung, Zytoprotektion oder Gewebereparatur involviert sind. Diese Resultate lieferten Hinweise auf eine neue Rolle von Caspase-1 bei der unkonventionellen Protein Sekretion. Durch diesen Mechanismus verbindet Stress-induzierte Caspase-1 Aktivierung die Entzündung direkt mit anderen Prozessen wie Zytoprotektion, zelluläres Überleben und Geweberegeneration.

Es war schon lange bekannt, dass humane Keratinozyten nach UV Bestrahlung IL-1 $\alpha$  und - $\beta$  sekretieren, wobei die intrazellulären Wege, welche die Reifung und Sekretion von IL-1 durch Keratinozyten regulieren, unbekannt sind. Unser Labor konnte zeigen, dass Keratinozyten Caspase-1 und Inflammasomproteine exprimieren und diese für die Sekretion von IL-1 $\beta$  benötigen. Ich untersuchte die Entzündungsreaktion der Haut von Caspase-1 Knockout-Mäusen

nach UV Bestrahlung. Die Infiltration von Neutrophilen in die Haut dieser Mäuse war signifikant reduziert im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Diese Resultate legen nahe, dass das Inflammasom in Keratinozyten ein wichtiger Regulator der Hautentzündung ist, was die Bedeutung der Haut als immunologische Barriere betont.

EBBP ist ein wenig charakterisiertes Protein, welches als das Produkt eines Östrogen- und KGF-regulierten Gens identifiziert wurde. Die Funktion von EBBP auf molekularer Ebene war bisher unbekannt. Unser Labor identifizierte ProIL-1 $\beta$  als einen Bindungspartner von EBBP. Durch nachfolgende Bindungsstudien und funktionelle Analysen zeigte sich, dass EBBP auch Komponenten des Inflammasomkomplexes wie Caspase-1 und NALP-1 bindet und die Sekretion von IL-1 $\beta$  in verschiedenen Zelltypen begünstigt. Als Teil meiner Doktorarbeit zeigte ich, dass endogenes EBBP in Makrophagen an ProIL-1 $\beta$ , Caspase-1 und NALP-1 bindet. EBBP erhöhte auch die Sekretion von IL-1 $\beta$  durch Keratinozyten nach UV Bestrahlung. Zusätzlich korrelierte die UV induzierte IL-1 $\beta$ -Sekretion durch Keratinozyten mit der Bindung von EBBP an dieses Zytokin. Um Einsicht in den Mechanismus, durch welchen EBBP die IL-1 $\beta$ -Sekretion reguliert, zu erhalten, identifizierte ich weitere EBBP Bindeproteine unter Verwendung eines Antikörper-basierten Proteomikansatzes. Interessanterweise sind die meisten Proteine, welche in Keratinozyten UV-abhängig an EBBP binden, in die Organisation des Zytoskeletts, seine Dynamik oder in die Bildung, den Transport oder die Fusion von Vesikeln involviert. Zusätzlich wurde die Migration von Keratinozyten durch reduzierte Expression von EBBP mit Hilfe von siRNA beeinträchtigt. Diese Resultate legen nahe, dass unkonventionelle Sekretion von IL-1 $\beta$  an die Dynamik des Zytoskeletts und Vesikeltransport gekoppelt ist und dass EBBP eine entscheidende Rolle in beiden Prozessen spielt.

Zusammenfassend lieferten die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Resultate wichtige Informationen über die Regulation der unkonventionellen Sekretion von IL-1 und anderen Proteinen durch Caspase-1 und EBBP. Die wichtigste Entdeckung war die Identifizierung eines neuen Weges, durch welchen Stress induzierte Caspase-1-Aktivierung zu Entzündung, Zytprotektion und regenerativen Prozessen führt.

---

## Summary

Mammalian cells export most proteins by the endoplasmic reticulum/Golgi-dependent pathway. However, some proteins are secreted via other, unconventional mechanisms, which are only poorly understood. These proteins include the pro-inflammatory cytokines interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-18, and IL-33, which require cleavage by caspase-1 for biological activity. Caspase-1 itself is activated by inflammasomes. The latter are multiprotein innate immune complexes initially identified in macrophages. The mechanisms underlying unconventional protein secretion have been a mystery up to now. In my thesis, I investigated the role of caspase-1, the inflammasomes and the caspase-1-binding protein estrogen-responsive B box protein (EBBP) in unconventional secretion of IL-1 and other proteins.

In the main part of my thesis I examined a possible function of caspase-1 as a regulator of unconventional protein secretion. It has been known that macrophages from caspase-1 knockout mice secrete less IL-1 $\beta$  but also less of the functional analogue IL-1 $\alpha$ . This is surprising, because the latter is not a substrate of caspase-1 and does not require proteolytic cleavage for receptor binding. Therefore, we were wondering whether caspase-1 activity is generally required for secretion of unconventionally released proteins. I could demonstrate that secretion of the leaderless proteins proIL-1 $\alpha$ , caspase-1, and fibroblast growth factor (FGF)-2 depends on caspase-1 activity. Although proIL-1 $\alpha$  and FGF-2 are not substrates of the protease, they physically interact with caspase-1. Secretome analysis using iTRAQ proteomics revealed caspase-1 mediated secretion of other leaderless proteins with known or unknown extracellular functions. Strikingly, many of these proteins are involved in inflammation, apoptosis, cytoprotection and/or tissue repair. These results provide evidence for a novel role of caspase-1 in alternative protein secretion. By this mechanism, stress-induced activation of caspase-1 directly links inflammation to cytoprotection, cell survival, and regenerative processes.

It has long been known that human keratinocytes secrete IL-1 $\alpha$  and - $\beta$  upon UV irradiation. However, the intracellular pathways, which regulate maturation and secretion of IL-1 by keratinocytes, are unknown. Our laboratory could demonstrate that keratinocytes express caspase-1 and inflammasome proteins, and that these proteins are required for secretion of IL-1 $\beta$  in keratinocytes. I investigated the inflammatory response of the skin of caspase-1 knockout mice upon UV-irradiation. Neutrophil infiltration into the skin of these mice was significantly reduced compared to wild-type mice. These results suggest that the inflammasome in keratinocytes is an important regulator of inflammation in the skin, which highlights the

importance of this organ as an immunological barrier.

EBBP is a poorly characterized protein, which was identified as the product of an estrogen- and KGF-regulated gene. However, the function of EBBP at the molecular level was largely unknown. Our laboratory identified proIL-1 $\beta$  as a binding partner of EBBP. Subsequent binding studies and functional analyses revealed that EBBP can also bind to components of the inflammasome complex such as caspase-1 and NALP-1 and enhances IL-1 $\beta$  secretion in different cell types. As part of my thesis, I demonstrated that endogenous EBBP binds to proIL-1 $\beta$ , caspase-1 and NALP-1 in macrophages. EBBP also enhanced secretion of IL-1 $\beta$  by keratinocytes after UV-irradiation. Furthermore, UV-induced IL-1 $\beta$  secretion in keratinocytes correlated with binding of EBBP to this cytokine. To gain insight into the mechanisms by which EBBP regulates IL-1 $\beta$  secretion, I identified additional EBBP binding proteins using an antibody-based proteomics approach. Interestingly, most of the proteins, which bind to EBBP in keratinocytes in a UV-dependent manner are involved in the organization of the cytoskeleton, its dynamics, or in the formation, trafficking or fusion of vesicles. Additionally, siRNA-mediated downregulation of EBBP inhibited keratinocyte migration. These results suggest that unconventional secretion of IL-1 $\beta$  is linked to cytoskeleton dynamics and vesicular trafficking and that EBBP plays a vital role in both processes.

Taken together, the results of this thesis provide insight into the regulation of unconventional secretion of IL-1 and other proteins by caspase-1 and EBBP. The most significant finding was the discovery of a novel pathway by which stress-induced caspase-1 activation leads to inflammation, cytoprotection, cell survival, and regenerative processes.