



Doctoral Thesis

The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes

Author(s):

Garstkiewicz, Martha

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010792325> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 23557

The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MARTHA GARSTKIEWICZ
Mag. rer. nat., University of Vienna

born on 20.11.1982

citizen of
Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
Prof. Dr. Annette Oxenius, co-examiner
PD Dr. Hans-Dietmar Beer, co-examiner

2016

Zusammenfassung

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von vielen cytoprotektiven Genen reguliert. Nrf2 ist imstande, auf eine Reihe von exogenen und endogenen Arten von Stress zu reagieren, indem es die Expression von Zielgenen induziert, deren Genprodukte den schädlichen Auswirkungen von zellulärem Stress entgegenwirken. Somit übt Nrf2 einen Schutzmechanismus aus, der das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen sicherstellen kann.

Nrf2 ist besonders in der Chemoprevention von Krebs und Arzneimittel-verursachter Toxizität von Bedeutung. Nrf2 wurde ein schützender Effekt in verschiedenen Krankheitsmodellen zugeschrieben und man geht davon aus, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors mittels Nrf2-aktivierender Substanzen einen therapeutischen Effekt ausübt. Nrf2 hat jedoch auch eine "dunkle Seite". Diese hat sich in Mutationen von Genen offenbart, die für Proteine im KEAP1-NRF2 Signalweg kodieren und so zu einer Überaktivierung von Nrf2 in unterschiedlichen Arten von Krebs führen. Interessanterweise wurde beschrieben, dass Nrf2 für die Aktivierung von Inflammasomen nötig ist, jedoch ist diese Rolle von Nrf2 bei Entzündungen umstritten.

Inflammasome sind Komplexe des angeborenen Immunsystems, die sich nach Detektion einer Reihe unterschiedlicher exogener und endogener Stressfaktoren – sogenannter PAMPs und DAMPs – zusammenfügen. Dies führt zur Aktivierung der Protease Caspase-1, die wiederum die entzündungsauslösenden Zytokine pro-IL-1 β und pro-IL-18 in deren reife Form überführt und für deren Ausschleusung aus der Zelle sorgt. Somit resultiert Inflammasomaktivierung in einer Entzündung im Organismus. Darüber hinaus bewirkt Inflammasomaktivierung Pyroptose, eine lytische Form von Zelltod, die die Entzündungsreaktion fördert.

Es wurde berichtet, dass oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die PAMPs und DAMPs im Signaltransduktionsweg nachgeschaltet sind, eine Rolle in der Aktivierung vom NLRP3-Inflammasom spielen. Daher ist es überraschend, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2, der für ROS-detoxifizierende Enzyme kodiert, für die Inflammasomaktivierung benötigt wird. Der zugrunde liegende Mechanismus war bisher unbekannt. Ausserdem wurde kürzlich berichtet, dass bestimmte Nrf2-aktivierende Substanzen, die die Expression von Nrf2-Zielgenen induzieren, die Inflammasomaktivierung blockieren.

Im Zuge meiner Doktorarbeit habe ich das Zusammenspiel von Nrf2 einerseits und von Nrf2-Aktivatoren andererseits mit dem Inflammasom studiert. Wir untersuchten die Rolle von Nrf2 bei der Inflammasomaktivierung und konnten mithilfe von Zellen der Maus und des Menschen bestätigen, dass Nrf2 für die Inflammasomaktivierung benötigt wird. Da Nrf2 ein Transkriptionsfaktor ist, wurde spekuliert, dass die Expression von Nrf2-Zielgenen für die Inflammasomaktivierung nötig ist. Unsere Resultate zeigen dagegen, dass Nrf2-Zielgene keine

Rolle in der NLRP3-Inflammasomaktivierung spielen. Weder in peritonealen Makrophagen von Mäusen, die eine konstitutiv aktive (ca) Version von Nrf2 exprimieren, noch in menschlichen Keratinozyten mit überexprimiertem caNrf2 war die Inflammasomaktivierung verstärkt, obwohl Nrf2-Zielgene verstärkt exprimiert wurden. Die Analyse der Sekretion von reifem IL-1 β nach Inflammasomaktivierung in Keratinozyten mit überexprimiertem Nrf2, einer Version von Nrf2 ohne Zellkernlokalisierungssequenz (NLS) oder dominant negativem (dn) Nrf2 hat gezeigt, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasomes nicht mit der Expression von Nrf2-Zielgenen korreliert ist, sondern eher mit der Verfügbarkeit von Nrf2 im Zytoplasma. Dies führte zu der Hypothese, dass eine direkte oder indirekte physische Interaktion zwischen dem Nrf2/Keap1-Komplex und dem Inflammasom dem Bedarf von Nrf2 für die Inflammasomaktivierung zugrunde liegt. Tatsächlich konnten wir eine Interaktion von überexprimierter Caspase-1 und allen Komponenten des Nrf2/Keap1/Cul3/Rbx1-Komplexes nachweisen.

Wir haben auch die Rolle von Nrf2-aktivierenden Substanzen bei der Aktivierung vom Inflammasom untersucht. Verschiedene dieser Substanzen blockierten das Inflammasom in Keratinozyten, THP-1-Zellen und menschlichen peripheren mononuclearen Blutzellen. In der Maus, also im lebenden Organismus, konnten wir zeigen, dass eine orale Zufuhr der Nrf2-aktivierenden Substanzen Sulforaphan (SFN) und Dimethylfumarat (DMF) die Inflammasom-abhängige Entzündung unterbinden kann. Das ist besonders interessant, da DMF als Medikament für die Behandlung von Psoriasis und Multipler Sklerose (MS) verwendet wird. Bei beiden Krankheiten wird ein Mitwirken des Inflammasoms im Krankheitsverlauf diskutiert. Der molekulare therapeutische Mechanismus von DMF in Patienten, die an Psoriasis oder MS leiden, ist weitgehend unbekannt. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass die anti-inflammatorische Wirkung von DMF – zumindest teilweise – auf eine Inhibierung des Inflammasoms zurückzuführen ist.

Zusätzlich haben wir untersucht, ob der Effekt von Nrf2-Aktivatoren und von Nrf2 auf das Inflammasom von den Zielgenen des Transkriptionsfaktors abhängig ist. Die Unterbindung der Proteinsynthese mittels Cycloheximid hat die SFN-vermittelte Hemmung des Inflammasoms in Keratinozyten und THP-1-Zellen nicht verhindert. Ausserdem hat SFN die Inflammasomaktivierung in dendritischen Mauszellen komplett gestoppt - sowohl normalen als auch Zellen ohne Nrf2. Diese Resultate zeigen, dass SFN das Inflammasom unabhängig von Nrf2 inhibiert.

Wir haben auch die Konsequenzen der NLRP3-Inflammasomaktivierung für die Expression und Aktivität von Nrf2 untersucht. Hier hat sich gezeigt, dass Nrf2-Protein rasch mittels eines zum Teil von Keap1-unabhängigen Mechanismus abgebaut wird. Diese Daten deuten darauf hin, dass der das Überleben von Zellen unterstützende Nrf2-Signalweg und der Zelltod-induzierende

Inflammasom-Signalweg in ein und derselben Zelle nicht zum selben Zeitpunkt aktiv sein können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Resultate dieser Arbeit eine wichtige Rolle von Nrf2 und insbesondere von Nrf2-aktivierenden Substanzen bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms belegen und eine neue Funktion von Nrf2 im Prozess der Entzündung zeigen, die unabhängig von der Expression von Nrf2-Zielgenen ist.

Summary

Nrf2 is a transcription factor that regulates the expression of many cytoprotective genes. In response to different exogenous and endogenous kinds of stress, Nrf2 upregulates its target genes, whose gene products help to combat harmful cellular stressors. Thereby Nrf2 represents a protective pathway, which allows cell survival under stress conditions.

Nrf2 is particularly important for chemoprevention in cancer development and protective in drug-induced toxicity. In many disease models protective effects have been attributed to Nrf2 and Nrf2 induction by Nrf2 activating compounds was shown to be beneficial. However, Nrf2 has also a “dark side”. Many mutations in the genes encoding proteins of the KEAP1-NRF2 pathway causing Nrf2 hyperactivity in different cancer types have been found. Interestingly, it was reported that expression of Nrf2 is required for inflammasome activation; however, this role of Nrf2 in inflammation is controversially discussed.

Inflammasomes are innate immune complexes, which assemble upon sensing of a wide range of different exogenous or endogenous stimuli, so called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs). This leads to activation of the protease caspase-1, which in turn processes the pro-inflammatory cytokines pro-IL-1 β and pro-IL-18 and regulates their secretion. Thus, inflammasome activation results in inflammation *in vivo*. Furthermore, inflammasome activation induces pyroptosis, a lytic form of cell death, which supports inflammation.

Oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) downstream of PAMPs and DAMPs have been implicated in NLRP3 inflammasome activation. Therefore, it is surprising that the transcription factor Nrf2, which induces the expression of ROS-detoxifying enzymes, has a role in inflammasome activation. So far, the underlying molecular mechanism was unknown. In addition, it was recently reported that certain Nrf2 activating compounds, which induce the expression of Nrf2 target genes, block inflammasome activation.

During my thesis, I studied the crosstalk between Nrf2 and Nrf2 activating compounds with inflammasomes. We investigated the role of Nrf2 in inflammasome activation and by using human and murine cells, we could confirm a requirement of Nrf2 for inflammasome activation. Since Nrf2 is a transcription factor, it has been speculated that Nrf2 target gene expression is required for inflammasome activation. In contrast, our results show that Nrf2 target genes are not involved in NLRP3 inflammasome activation. Neither in peritoneal macrophages derived from mice expressing constitutively active (ca) Nrf2, nor in human primary keratinocytes (HPKs) overexpressing caNrf2, inflammasome activation was increased, although target gene expression was induced. Analysis of the secretion of mature IL-1 β upon inflammasome

activation in HPKs overexpressing wild-type Nrf2, a nuclear localization sequence (NLS)-deficient mutant of Nrf2, or dominant negative (dn) Nrf2, demonstrated that NLRP3 inflammasome activation is not correlated with the expression of Nrf2 target genes, but rather with the abundance of Nrf2 in the cytoplasm. Therefore, we hypothesized that a direct or indirect physical interaction between the Nrf2/Keap1 complex and inflammasomes might underlie the requirement of Nrf2 for inflammasome activation. Indeed, we detected an interaction between overexpressed caspase-1 and all components of the Nrf2/Keap1/Cul3/Rbx1 complex.

We also analysed the effect of Nrf2 activating compounds on inflammasome activation. Several of these compounds blocked the inflammasome in HPKs, THP-1 cells and in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *In vivo* in mice, we could show that oral application of the Nrf2 activating compounds sulforaphane (SFN) and dimethyl fumarate (DMF) was also able to dampen inflammasome-dependent inflammation. This is particularly interesting, since DMF is used as a drug for the treatment of patients suffering from psoriasis and multiple sclerosis (MS). In both diseases an involvement of inflammasomes is discussed. The mechanisms of action of DMF in psoriasis or MS patients are only poorly characterised. Our results suggest that the anti-inflammatory activity of DMF – at least in part – is attributed to inflammasome inhibition.

In addition, we examined whether the effect of Nrf2 activators and of Nrf2 on the NLRP3 inflammasome is dependent on Nrf2 target gene expression. Blockade of protein synthesis by cycloheximide did not prevent SFN-mediated inflammasome inhibition in HPKs and THP-1 cells. Furthermore, SFN completely abolished inflammasome activation in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from both, wild-type and Nrf2 KO mice. These results demonstrate that SFN inhibits the inflammasome independently of Nrf2.

Finally, we studied the consequence of NLRP3 inflammasome activation on Nrf2 expression and activity. We found Nrf2 to be rapidly degraded by a mechanism that is in part independent of Keap1. These data suggest that the pro-survival Nrf2 pathway and cell death-inducing inflammasome activation, cannot be active in one cell at the same time.

Taken together, the findings described in this thesis prove an important role of Nrf2 and particularly of Nrf2 activating compounds in NLRP3 inflammasome activation and point to a novel function of Nrf2 in inflammation, independently of Nrf2-induced gene expression.