

DISS. ETH NO. 29112

**NLRP1 activation in human keratinocytes cultivated in  
organotypic skin cultures induces a psoriasis-like  
phenotype**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

*MICHELA DI FILIPPO*

MSc Medical Biotechnology,  
University of Milano Bicocca

born *November 14<sup>th</sup> 1992*

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Sabine Werner*

*Prof. Dr. Helmuth Gehart*

*PD Dr. Hans-Dietmar Beer*

2023

## SUMMARY

Inflammasomes are multi-protein complexes that induce inflammation upon sensing of stress factors. They are composed of a sensor protein with different structures, such as NLRP1 (NLR (NOD-like receptor) family pyrin domain containing 1), the adaptor protein ASC and the effector protease caspase-1. When activated, the sensor induces oligomerization of ASC monomers, termed ASC specks, which activate caspase-1. Caspase-1 in turn cleaves the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-18 and gasdermin D (GSDMD) into their mature and active forms. N-terminal GSDMD forms pores in the plasma membrane, which allow the release of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-18, inducing inflammation, and trigger pyroptosis, a lytic form of cell death which supports inflammation.

Inflammasome activation helps to restore homeostasis when disturbed by a stressor. However, chronic inflammasome activation underlies the pathology of common inflammatory diseases.

NLRP1 is the principle inflammasome sensor in human keratinocytes, but is also expressed by monocytes and neutrophils. Up to now, only genetic hints suggest a role of NLRP1 in human keratinocytes and human skin. SNPs in *NLRP1* are associated with different (auto)inflammatory diseases which mainly affect the skin, such as vitiligo, atopic dermatitis, and psoriasis, and germline gain-of-function mutations in *NLRP1* cause skin inflammation and predispose to the development of squamous cell carcinoma. Nevertheless, a formal proof that point to a role of NLRP1 expressed by keratinocytes in skin inflammation is missing.

NLRP1 is activated by UVB radiation, the main inducer of sunburn. As keratinocytes absorb UVB, it is believed that NLRP1 activation represents the molecular switch underlying skin inflammation in sunburn, with IL-1 $\beta$  being the main player. Moreover, NLRP1 is activated by dsRNA upon viral infection, the anticancer drug talabostat and 3C proteases from viruses. UVB- and dsRNA-dependent NLRP1 activation requires phosphorylation by p38 kinase.

In this thesis, we tested if activation of NLRP1 in human primary keratinocytes (HPKs) induces skin inflammation and could have a role in sunburn. As the NLRP1 pathway is not conserved in murine keratinocytes, we addressed this question by using a physiologically relevant three-dimensional (3D) fibroblast-derived matrix skin equivalent (SE) in which wild-type or HPKs lacking the expression of inflammasome components were cultivated on top of the fibroblast layer.

We detected ASC specks, which reflect inflammasome activation, exclusively in differentiated HPKs of SEs and human skin, while in 2D culture this occurs in proliferating keratinocytes. Importantly, as HPKs in monolayer highly express pro-IL-1 $\beta$  and secrete high amount of the active cytokine upon NLRP1 activation, NLRP1 and inflammasome activation in general has always been equated to generation of IL-1 $\beta$ . However, keratinocytes in human skin and SEs express very low levels of pro-IL-1 $\beta$ , but higher levels of pro-IL-36 $\gamma$ , a cytokine of the IL-1 family that induces a pro-inflammatory

signature overlapping with the one induced by IL-1. This suggests that the role of keratinocyte-derived IL-1 $\beta$  in human skin in inducing inflammation, at least at the beginning of inflammasome activation, might have been overestimated.

NLRP1 activation in keratinocytes of SEs resulted in a psoriatic phenotype, reflected by characteristic histopathological features and induction of expression of pro-inflammatory genes, including the gene encoding IL-36 $\gamma$ , a cytokine with a key role in psoriasis. While psoriasis has always been considered an immune-mediated inflammatory skin disease, in our model the psoriatic phenotype was induced in the absence of immune cells, pointing to an important role of keratinocytes and NLRP1 in the initial phases of psoriasis. Most importantly, ASC specks and therefore active inflammasomes were detected in suprabasal keratinocytes of psoriatic lesion. These results strongly suggest activation of NLRP1 in keratinocytes in psoriasis, most likely induced by dsRNA, which accumulates in psoriatic keratinocytes due to decreased A-to-I editing and is released upon necrosis. dsRNA-induced inflammasome activation is supported by LL-37, a cathelicidin highly expressed in psoriatic epidermis, and required phosphorylation by p38, a stress-activated kinase highly active in psoriatic epidermis.

Whereas critical roles of IL-1 and IL-36 $\gamma$  in psoriasis have been previously established, our results support the concept that keratinocytes are the driver and, consequently, an accessible therapeutic target for topical treatment in psoriasis. Moreover, as NLRP1 is the upstream regulator of pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-36 $\gamma$ , its pharmacological inhibition could block both pathways at the same time, having therefore a double function.

Interestingly, we found that prolonged NLRP1 activation or treatment with high concentrations of IL-1 caused massive necrosis of the epidermis in SEs, most likely induced by IL-1 receptor type I (IL-1RI) activation in fibroblasts. As a similar extent of necrosis occurs in patients suffering from toxic epidermal necrolysis, a very rare and life threatening disease with incompletely understood pathophysiology, the human recombinant IL-1R antagonist Anakinra could represent a novel therapeutic option for these patients.

Surprisingly, our experiments revealed that UVB-dependent NLRP1 activation in keratinocytes of SEs is not essential for the induction of an inflammatory signature resembling sunburn. Rather, IL-1 $\alpha$  that is released upon UVB-induced, but inflammasome-independent necrosis in SEs, induces expression of sunburn-associated cytokines and might drive sunburn in human skin as well.

## SOMMARIO

Gli inflammasomi sono complessi multiproteici citoplasmatici che inducono infiammazione dopo il riconoscimento di fattori che generano uno stress cellulare. Essi sono composti da una proteina sensore, una proteina adattatrice detta ASC e dalla proteina effettrice con attività proteasica caspasi-1. Quando la proteina sensore viene attivata dal fattore di stress, essa induce oligomerizzazione di ASC, portando alla formazione dei cosiddetti “ASC specks”, che conseguentemente attivano caspasi-1.

Caspasi-1, a sua volta attiva, tramite taglio proteolitico, le citochine pro-infiammatorie interleuchina (IL)-1 $\beta$  e IL-18, e gasdermina D (GSDMD). La parte N-terminale di GSDMD si inserisce nella membrana plasmatica formando pori da cui vengono rilasciate IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-18. La formazione di questi pori innesca una morte cellulare di tipo litico, definita piroptosi.

Sebbene il ruolo degli inflammasomi sia quello di eliminare il fattore di stress e ristabilire l'omeostasi, la loro attivazione cronica può essere alla base di malattie infiammatorie.

NLRP1 è la proteina sensore degli inflammasomi più presente nei cheratinociti umani ed è anche espressa da monociti e neutrofili. Al momento, un possibile ruolo di NLRP1 nei cheratinociti umani e nella pelle viene suggerito solo da evidenze genetiche. Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs, dall'inglese *single nucleotide polymorphisms*) in *NLRP1* sono associati a diverse malattie (auto)infiammatorie che colpiscono la pelle, come per esempio la vitiligine, la dermatite atopica e la psoriasi. Inoltre, mutazioni con guadagno di funzione (o GOF, dall'inglese *gain of function*) in *NLRP1* causano infiammazione della pelle e predispongono allo sviluppo di carcinoma a cellule squamose. Tuttavia, manca una prova formale che dimostri il ruolo di NLRP1 espresso dai cheratinociti umani nell'indurre infiammazione alla pelle.

La radiazione UVB attiva NLRP1 ed è la principale causa di scottatura solare. Poiché i cheratinociti assorbono le radiazioni UVB, si pensa che l'attivazione di NLRP1 nei cheratinociti e il conseguente rilascio di IL-1 $\beta$  possano scatenare l'infiammazione da scottatura solare.

NLRP1 può anche essere attivato da dsRNA (RNA a doppio filamento, dall'inglese *double-stranded*), dal farmaco antitumorale talabostat e dalla proteasi 3C di derivazione virale.

L'attivazione di NLRP1 da parte di UVB e dsRNA richiede la fosforilazione della proteina chinasi p38.

In questa tesi, ho investigato se l'attivazione di NLRP1 nei cheratinociti umani primari (HPKs, dall'inglese *human primary keratinocytes*) possa indurre infiammazione della pelle e se possa avere un ruolo nelle scottature solari. Poiché i cheratinociti murini non esprimono a livello genetico NLRP1 e pro-IL-1 $\beta$ , ho svolto questo progetto utilizzando un modello di coltura organotipica tridimensionale fisiologicamente rilevante (equivalente di pelle, dall'inglese *skin equivalent*, SE). In questo modello i cheratinociti wild-type e knock-out per le proteine componenti degli inflammasomi sono stati coltivati sopra strutture dermiche prodotte dai fibroblasti stessi.

Abbiam rilevato che la formazione degli ASC specks, la quale riflette un'attivazione dell'inflammasoma, negli SEs e nella pelle umana avveniva nei cheratinociti soprabasali differenziati, mentre utilizzando monoculture bidimensionali ciò si verifica nei cheratinociti proliferanti.

L'attivazione di NLRP1 è sempre stata considerata come la maturazione e il rilascio di IL-1 $\beta$ , poiché i cheratinociti in monocultura esprimono elevati livelli di pro-IL-1 $\beta$ . Tuttavia, i cheratinociti nella pelle umana e negli SEs esprimono bassi livelli di pro-IL-1 $\beta$ . Piuttosto, essi sono caratterizzati da alti livelli di pro-IL-36 $\gamma$ , una citochina infiammatoria che induce un *pathway* in parte condiviso da quello indotto da IL-1. Ciò suggerisce che, almeno nelle fasi iniziali dell'attivazione dell'inflammasoma, il ruolo di IL-1 $\beta$  derivata dai cheratinociti nell'indurre infiammazione sia sovrastimato.

Nonostante si sia già stabilito che IL-1 e IL-36 $\gamma$  abbiano un ruolo critico nella psoriasi, i nostri risultati supportano il concetto che i cheratinociti siano gli iniziatori della malattia e, di conseguenza, un bersaglio terapeutico accessibile per il trattamento topico nella psoriasi. Inoltre, poiché NLRP1 regola l'espressione di pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-36 $\gamma$ , con la sua inibizione farmacologica si conseguirebbe un doppio effetto terapeutico.

Inoltre, abbiamo osservato che l'attivazione prolungata di NLRP1 o il trattamento con alte concentrazioni di IL-1 causano una massiccia necrosi dell'epidermide negli SEs, molto probabilmente indotta dall'attivazione del recettore IL-1 di tipo 1 (IL-1RI) nei fibroblasti. Poiché una necrosi simile si verifica in pazienti affetti da necrosi epidermica tossica, una malattia molto rara e mortale con fisiopatologia non completamente compresa, il farmaco Anakinra, una proteina ricombinante umana antagonista di IL-1RI, potrebbe rappresentare una nuova opzione terapeutica per questi pazienti.

Infine, abbiamo dimostrato inaspettatamente che l'attivazione di NLRP1 dipendente da UVB nei cheratinociti degli SEs non è essenziale per indurre una *signature* infiammatoria simile alla scottatura solare. Piuttosto, IL-1 $\alpha$ , rilasciata a causa della necrosi indotta da UVB e indipendentemente dall'attivazione dell'inflammasoma, induce l'espressione di citochine associate alle scottature solari negli SEs e potrebbe anche provocare scottatura solare nella pelle umana.