



Doctoral Thesis

The role of Rip2 kinase and bacterial infections in shaping innate and adaptive immune responses

Author(s):

Nembrini, Chiara

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005836176> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

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. 18170

**The role of Rip2 kinase and bacterial infections
in shaping innate and adaptive immune responses**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH
for the degree of
Doctor in Natural Sciences

Presented by
CHIARA NEMBRINI
Dipl. Natw. ETH
born August 7, 1980
citizen of Camorino (TI)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Manfred Kopf, examiner
Dr. Benjamin J. Marsland, co-examiner
Dr. Federica Sallusto, co-examiner

2008

1. Summary

Innate and adaptive immune responses tightly regulate each other to ensure a high degree of protection against pathogens or appropriate responsiveness to allergens. Several effector proteins play a crucial role in the initiation of both innate and adaptive immune responses. One such protein is the kinase Rip2, which was initially described to induce inflammation upon Toll-like and Nod-like receptor stimulation, as well as to mediate signaling downstream of the T cell receptor. In the first part of this thesis, we sought to study the role of Rip2 in regulating T cell activation, proliferation and cytokine production in response to a variety of stimuli. Moreover, we investigated the importance of Rip2 kinase activity in mediating signaling downstream of Nod1 and Nod2. Our results show that Rip2 kinase is dispensable for the generation of adaptive T cell responses both *in vitro* following polyclonal or specific antigen stimulation, as well as *in vivo* upon LCMV or *Listeria monocytogenes* infections. We could further demonstrate that the kinase activity of Rip2 is critical for the stability of the protein. Bone marrow-derived dendritic cells expressing kinase-dead Rip2 mutants displayed decreased Rip2 protein levels and impaired inflammation in response to Nod1 and Nod2 stimulation. Similar results were obtained *in vivo*, suggesting that kinase-dependent Rip2 autophosphorylation might represent an important regulatory mechanism for the induction of Nod1- and Nod2-dependent immune responses. Our data thus challenge the importance of Rip2 kinase in the initiation of adaptive immune responses, but highlight a role for its kinase activity in regulating innate immunity.

Exposure to bacteria and their products, especially early in life, has been associated with decreased incidence of allergy, indicating that environmental factors have a strong impact on shaping the development of immunity or disease. However, the mechanisms underlying these beneficial effects remain poorly understood. As described in the second part of this thesis, we developed a mouse model in which bacterial challenge in the lung suppressed allergic airway inflammation. We found that intranasal administration of *Escherichia coli* could inhibit airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia and effector Th2 immune responses in a TLR4 dependent way, but independently of Th1 or regulatory T cells. Moreover, *E.coli*-treated mice displayed impaired dendritic cell maturation and function in the lung, but not in the draining lymph node in the activation of effector Th2

cells. Of note, we also found that *E.coli* treatment induced high frequencies of $\gamma\delta$ T cells in the respiratory tract, and further demonstrated that these bacterially-induced cells play an important role in the regulation of airway hyperresponsiveness. Taken together these data reveal a novel pathway of immunoregulation in the airways which has important implications for both basic lung immunology and the development of new therapeutic strategies.

2. Riassunto

Le risposte immunitarie innate e specifiche interagiscono fortemente allo scopo di proteggere l'individuo da agenti patogeni e assicurare reazioni appropriate a sostanze allergiche. Diverse proteine sono implicate nell'attivazione di entrambe le risposte immunitarie. Una di queste è la chinasi Rip2, che fu inizialmente descritta come una proteina molto importante per la trasduzione di segnali inviati dai recettori Toll-like e Nod-like e per l'attivazione dei linfociti T. In questa tesi di dottorato abbiamo studiato il ruolo di Rip2 nel regolare l'attivazione, la proliferazione e la produzione di citochine da parte di linfociti T in risposta a vari stimoli. Inoltre abbiamo analizzato in dettaglio l'importanza dell'attività fosforilatrice di Rip2 nella trasduzione di segnali cellulari indotti dai recettori Nod-like Nod1 e Nod2. I nostri risultati indicano che la chinasi Rip2 non è necessaria per lo sviluppo di risposte immunitarie specifiche *in vitro* come pure *in vivo* in risposta ad infezioni causate da LCMV e da *Listeria monocytogenes*. Abbiamo poi dimostrato che l'attività di chinasi di Rip2 è essenziale per mantenere la stabilità della proteina. Infatti, il livello di Rip2 è fortemente ridotto in cellule dendritiche che esprimono una variante di Rip2 in cui l'attività di chinasi è compromessa. Lo stesso risultato è stato confermato *in vivo* con topi Rip2 knock-in, portandoci alla conclusione che l'autofosforilazione di Rip2 è un meccanismo importante per il controllo di risposte immunitarie indotte dall'attivazione di Nod1 e Nod2. Per questo motivo i nostri risultati mettono in discussione il fatto che Rip2 sia necessaria per l'attivazione di cellule T effettrici, e contemporaneamente sottolineano l'importanza della fosforilazione di questa proteina nel controllare le risposte immunitarie innate.

Il diretto contatto con batteri e derivati è stato più volte associato ad una minore probabilità di sviluppare risposte allergiche, attribuendo perciò a determinati fattori ambientali un ruolo considerevole nell'influenzare il sistema immunitario. Tuttavia i meccanismi responsabili di questi effetti benefici rimangono fino ad oggi senza una convincente spiegazione. Come descritto nella seconda parte di questa tesi, abbiamo sviluppato un modello in cui la somministrazione per via intranasale di batteri porta ad un'abolizione di successive risposte allergiche. I topi trattati con *Escherichia coli* mostrano minori sintomi allergici quali iperreattività bronchiale, infiltrazione di eosinofili nei polmoni e attivazione di linfociti T helper 2. Come abbiamo potuto appurare, queste

diminuzioni dipendono dalla stimolazione del recettore TLR4, ma non dall'aumentata attivazione di cellule effettrici T helper 1 o cellule T regolatorie. Abbiamo poi constatato che in seguito alla somministrazione dei batteri, lo stato di maturazione e la funzionalità delle cellule dendritiche residenti nei polmoni, ma non di quelle dei linfonodi drenanti, è ridotta in maniera significativa. Inoltre, abbiamo osservato che l'inalazione di batteri causa nelle vie respiratorie un afflusso di linfociti T $\gamma\delta$, che sembrano avere un ruolo molto importante nel controllo dell'iperreattività bronchiale. In conclusione, i nostri risultati svelano un nuovo meccanismo regolatorio che ha implicazioni importanti non solo per le risposte immunitarie dei polmoni in generale, ma anche per lo sviluppo di nuove terapie.