

DISS. ETH NO. 19870



Innate Instruction of Adaptive Immunity in Respiratory Bacterial Infection

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences ETH Zurich

presented by

Gerhard Trunk

Diplom Biologe, t.o. (technical orientation), University of Stuttgart

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Annette Oxenius (examiner)

Prof. Dr. Burkhard Ludewig (co-examiner)

Zurich, 2011

1. Summary

The innate immune system recognizes invading pathogens via conserved germline encoded pattern recognition receptors (PRRs), which detect a limited number of non-self molecules. However, the continuous development of microbial invasion strategies made a co-evolution of the vertebrate immune system necessary and led to the generation of a highly diverse and specific adaptive immune system, which is able to recognize virtually any antigen. Nevertheless, this advantage bears the risk of self-recognition and -destruction, which requires potent control mechanisms. Instructive signals from innate cells represent one mean to control adaptive immune activation. This is in particular important for CD4 T cells, whose activation precedes adaptive defense mechanisms and who play a decisive role in the regulation of immune responses by differentiating into different T cell lineages such as Th1, Th2, Th17 or iTreg.

In this thesis we used *Legionella pneumophila* (*Lpn*) as a model pathogen to study CD4 T cell priming and lineage differentiation. This facultative intracellular bacterium can be found in natural aquatic habitats where it parasitizes protozoa as its natural host. However, after accidental inhalation it can also infect and replicate within alveolar macrophages and cause, especially in elderly or immuno-compromised individuals, Legionnaires' disease, a severe and potentially fatal pneumonia. Defense of primary infection with *Lpn* is largely dependent on innate immunity, however, complete bacterial clearance and protection from re-infection depends on adaptive immune mechanisms. By means of a type IV secretion system (T4SS) *Lpn* secretes effector molecules into the host cell and thereby generates an intracellular *Legionella* containing vacuole (LCV), which evades lysosomal fusion. It thereby triggers a variety of PRRs, membrane bound but also cytosolic receptors, and therefore represents an ideal model organism to study the relative impact of these signals on the ensuing T cell response.

We developed a flexible neoantigen expression system, based on transient GFP-Ova fusion protein expression in *Lpn* and Ova-specific OT-II and OT-I cells, which allows to study CD4 and CD8 T cell responses to this vacuolar pathogen *in vitro* and *in vivo*. We show that both OT-I and OT-II cells differentiate into effector cells upon co-incubation with *Lpn* GFP-Ova infected dendritic cells (DCs), whereas co-

incubation with infected macrophages revealed only OT-II activation, indicating an important role for cross-presentation mechanisms in *Lpn* infected DCs. In addition, *in vivo* experiments demonstrated development of IFN γ producing OT-I and IFN γ and IL-17 expressing OT-II effector cells upon intranasal *Lpn* GFP-Ova infection. Due to their decisive function in the regulation of immune responses, we focused on the study of CD4 T cells.

We show that OT-II cells get exclusively primed and proliferate in the mediastinal lymph node (MLN) upon respiratory *Lpn* GFP-Ova infection. Although suggested otherwise, we demonstrate that priming of OT-II cells does not require an *Lpn* T4SS and thus is independent of cytosolic pattern recognition. In fact, T4SS-deficiency even led to increased initial OT-II proliferation in the MLN, indicating increased presentation of *Lpn*-derived antigens from lysosomal compartments compared to the LCV. However, T4SS-deficiency resulted in impaired migration of OT-II cells from the MLN to the lung, reduced OT-II cell survival and complete failure of Th1/Th17 effector cell differentiation. This finding suggests a crucial role for innate cytosolic pattern recognition in the generation of an inflammation that promotes adaptive immunity and might be necessary to overcome a state of adaptive tolerance to *Lpn*. Interestingly, development of CD4 T cell effector functions upon *Lpn* wild type infection was solely restricted to the lung, which correlated with increased expression of master transcription factors in lung CD4 T cells, indicating an important role for lung inflammation in T cell differentiation.

In addition, Th17 development was dependent on recognition of *Lpn* derived flagellin, as demonstrated in infection experiments with non-flagellated *Lpn*, and required, on the host side, the IPAF-inflammasome-IL-1 axis. Moreover, adoptive transfer experiments in IL-1R $^{-/-}$ mice revealed impaired Th17 differentiation, indicating that IL-1 is not directly acting on T cells.

Interestingly, in the absence of MyD88 a Th2/Th1 response was induced, as indicated by Gata-3 and T-bet up-regulation and some IL-4/IFN γ double producers, whereas Th17 was abolished. Infection experiments with thymidine auxotroph *Lpn* demonstrated that a high pathogen load and proliferation of bacteria was not decisive but promoted Th2 induction, indicating an important role for MyD88-dependent Toll-like receptor (TLR) signaling in the instruction of Th1/Th17 lineage differentiation in respiratory *Lpn* infection.

2. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem spürt Krankheitserreger mittels konservierter und in der Keimbahn kodierter „pattern recognition receptors“ (PRRs) auf, welche eine begrenzte Zahl an nicht-selbst Molekülen erkennen. Die Evolution mikrobieller Invasionsstrategien machte jedoch eine Weiterentwicklung des Immunsystems der Vertebraten notwendig und führte zur Entstehung eines hoch diversen und spezifischen adaptiven Immunsystems, welches in der Lage ist jede Form von Antigen zu erkennen. Allerdings bringt dieser Vorteil das Risiko der Selbst-Erkennung und Selbst-Zerstörung mit sich, wodurch eine strenge Kontrolle notwendig wird. Zellen des angeborenen Immunsystems können durch die Aussendung instruktiver Signale die Aktivierung der adaptiven Immunantwort überwachen. Insbesondere für CD4 T Zellen ist dieser Vorgang von entscheidender Bedeutung. Diese Zellen sind in der Lage sich in die T Zell Linien Th1, Th2, Th17 und iTreg zu entwickeln und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort.

Wir verwendeten *Legionella pneumophila* (*Lpn*) als Modellpathogen um die initiale Aktivierung und Differenzierung von CD4 T Zellen zu untersuchen. Dieses fakultativ intrazelluläre Bakterium lebt normalerweise in aquatischen Lebensräumen als Parasit von Einzellern. Es kann jedoch nach versehentlichem Einatmen auch Makrophagen der Lunge infizieren und sich in diesen vermehren, was vor allem bei älteren oder immunkomprimierten Menschen zur Legionärskrankheit führen kann, einer schweren und mitunter tödlichen Lungenentzündung. Bei der Erstinfektion mit *Lpn* ist vor allem die angeborene Immunantwort von Bedeutung, für die vollständige Beseitigung der Bakterien und zum Schutz vor erneuter Infektion spielt jedoch das adaptive Immunsystem eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe eines Typ IV Sekretionssystems (T4SS) injizieren *Lpn* Effektormoleküle in die Wirtszelle und schaffen sich somit eine Legionellen-Vakuole (LV), die nicht mit Lysosomen fusioniert. Dabei werden verschiedene membrangebundene und zytoplasmatische PRRs aktiviert, was *Lpn* zu einem idealen Modellorganismus macht, um den relativen Einfluss dieser Signale auf die T Zell Antwort zu untersuchen. Wir entwickelten ein flexibles Neoantigen-Expressionssystem, basierend auf GFP-Ova exprimierenden *Lpn* und Ova-spezifischen OT-II und OT-I Zellen, um die CD4 und

CD8 T Zell Antwort gegenüber diesem Pathogen *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können. Wir konnten zeigen, dass sowohl OT-I als auch OT-II Zellen nach Inkubation mit *Lpn* GFP-Ova infizierten dendritischen Zellen (DCs) in Effektorzellen differenzieren. Dies war nicht der Fall nach Inkubation mit *Lpn* GFP-Ova infizierten Makrophagen was auf eine wichtige Rolle der Kreuzpräsentation in infizierten DCs hinweist. Darüber hinaus konnten wir demonstrieren dass nach intranasaler Infektion mit *Lpn* GFP-Ova OT-I Zellen in IFN γ , und OT-II Zellen in IFN γ und IL-17 produzierende Effektorzellen differenzieren. Aufgrund ihrer entscheidenden Funktion bei der Regulation der Immunantwort konzentrierten wir uns in dieser Arbeit auf CD4 T Zellen.

Wir konnten zeigen, dass nach intranasaler *Lpn* GFP-Ova Infektion, OT-II Zellen ausschliesslich im Lunge drainierenden Lymphknoten (LDL) erstmals aktiviert werden und proliferieren. Entgegen anderer Behauptungen konnten wir demonstrieren, dass diese initiale Aktivierung kein *Lpn* T4SS benötigt und somit unabhängig von zytoplasmatischer „pattern recognition“ ist. Abwesenheit eines T4SS führte sogar zu anfänglich verstärkter Proliferation von OT-II Zellen im LDL, was auf eine vermehrte Präsentation von *Lpn*-Antigenen aus der LV hinweist. Langfristig resultierte T4SS-Defizienz jedoch in verringerter Migration der OT-II Zellen vom LDN in die Lunge, schnellerem Absterben der OT-II Zellen und einer fehlenden Differenzierung in Th1/Th17 Effektorzellen. Dies weist auf eine entscheidende Rolle der zytoplasmatischen „pattern recognition“ bei der Entstehung einer die adaptive Immunantwort fördernden Entzündung hin und könnte notwendig sein, um einen Zustand der adaptiven Toleranz gegenüber *Lpn* zu überwinden. Interessanterweise produzierten CD4 T Zellen Effektorfunktionen ausschliesslich in der Lunge, was mit einer erhöhten Expression von Master-Transkriptionsfaktoren übereinstimmte und auf eine wichtige Rolle der entzündeten Lungenumgebung in der T Zell Differenzierung hinweist.

Zudem konnten wir zeigen, dass die Th17 Antwort auf der Pathogen Seite von der Erkennung von Flagellin und auf der Seite des Wirts von der IPAF-inflammasome-IL-1 Achse abhängt. Darüber hinaus zeigten „adoptive transfer“ Experimente in IL-1 R-/- Mäusen beeinträchtigte Th17 Differenzierung, was darauf hindeutet, dass IL-1 nicht direkt mit T Zellen interagiert.

Interessanterweise wurde in Abwesenheit von MyD88 eine Th2/Th1 Antwort induziert, die wir anhand der Gata-3 und T-bet Hochregulation und einigen IL-4/IFN γ

doppelproduzierenden Zellen messen konnten. Unter Verwendung von thymidin-auxotrophen *Lpn* konnten wir zeigen, dass eine hohe Pathogenzahl und Proliferation der Bakterien nicht entscheidend für die Induktion der Th2 Antwort ist. Dies deutet auf eine bedeutende Rolle von MyD88-abhängigen Toll-like Rezeptor (TLR) Signalen in der Instruktion der Th1/Th17 Linie bei der respiratorischen *Lpn* Infektion hin.