

DISS. ETH NO. 23020

**TNF-dependent alveolar macrophage and ROS-dependent
neutrophil mediated mechanisms control *Legionella pneumophila*
lung infection**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH

(DR. SC. ETH ZURICH)

presented by

PASCAL D. S. ZILTENER

MSc, Dalhousie University

born on 13.01.1982

Winterthur, Zürich / Schübelbach, Schwyz

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Annette Oxenius (examiner)
Prof. Dr. Salomé LeibundGut (co-examiner)
Prof. Dr. Pascal Schneider (co-examiner)

Zürich, 2015

Summary

Legionella pneumophila is a facultative intracellular bacterium that lives in aquatic environments where it parasitizes amoeba. However, upon inhalation of contaminated aerosols it can infect and replicate in macrophages, including human alveolar macrophages (AM), which can result in Legionnaires' disease, a severe form of pneumonia. Upon experimental airway infection of mice, *L. pneumophila* is rapidly controlled by innate immune mechanisms. Here we identified, on a cell-type specific level, the key innate effector functions responsible for rapid control of infection. We show that in addition to the well-characterized NLRC4-NAIP5 flagellin recognition pathway, tumor necrosis factor (TNF) and reactive oxygen species (ROS) are also essential for effective innate immune control of *L. pneumophila*. While ROS are essential for the bactericidal activity of neutrophils, AM rely on neutrophil and monocyte-derived TNF signaling via TNFR1 to restrict bacterial replication. This TNF-mediated antibacterial mechanism depends on cathepsin B, the acidification of lysosomes and their fusion with *L. pneumophila* containing vacuoles (LCVs), and is independent of NLRC4, caspase-1, caspase-11 and ROS. In this thesis, we highlight the differential utilization of innate effector pathways to curtail intracellular bacterial replication in specific host cells upon *L. pneumophila* airway infection. In addition, these studies expand our knowledge of the mechanisms by which TNF contributes to the control of intracellular pathogens.

Résumé

Legionella pneumophila est une bactérie facultative intracellulaire qui vit dans des environnements aquatiques, où elle se reproduit de manière parasitaire dans les amibes. Cependant une fois qu'elle est aspirée dans les poumons d'un humain (ou d'une souris), elle peut infecter et se reproduire dans les macrophages alvéolaires (MA), ce qui peut causer une pneumonie sévère nommée la maladie du légionnaire. Après infection expérimentale des voies respiratoires chez la souris, *L. pneumophila* est rapidement contrôlée par des mécanismes immunitaires innés. Dans nos recherches, nous avons identifié pour plusieurs types cellulaires les principales fonctions effectrices innées permettant le contrôle rapide de cette infection. Nous montrons qu'en plus de la voie immunitaire bien caractérisée qui reconnaît la flagelline grâce à NAIP5-NLRC4, le facteur de nécrose tumorale (TNF) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont également essentiels pour le contrôle immunitaire inné de *L. pneumophila*. Alors que les ROS sont essentiels à l'activité bactéricide des neutrophiles, les macrophages alvéolaires dépendent du TNF produit par les neutrophiles et les monocytes, qui transmet un signal dans les MA via le TNFR1 pour empêcher la réplication de *L. pneumophila*. Ce mécanisme antibactérien médié par le TNF dépend de la cathepsine B, de l'acidification des lysosomes et de leur fusion avec avec les vacuoles contenant *L. pneumophila*, et est indépendant du NLRC4, de la caspase-1, de la caspase-11 et des ROS. Dans cette thèse, nous mettons en évidence l'utilisation différentielle des voies effectrices innées pour limiter la réplication bactérienne intracellulaire dans des cellules hôtes spécifiques, dans le contexte d'une infection des voies respiratoires par *L. pneumophila*. En outre, ces études approfondissent nos connaissances sur les mécanismes par lesquels le TNF lutte contre les agents pathogènes intracellulaires.