

The role of IL-1 and IL-36 cytokines in antifungal immunity

Doctoral Thesis

Author(s):

Bindszus, Mareike

Publication date:

2018

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000253131>

Rights / license:

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

DISS. ETH. NO. 24862

THE ROLE OF IL-1 AND IL-36 CYTOKINES IN ANTIFUNGAL IMMUNITY

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

presented by
MAREIKE BINDSZUS

M.Sc., University of Hamburg

born on 19.10.1987
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Manfred Kopf; examiner
Dr. Jan Kisielow; co-examiner
Prof. Dr. Salomé LeibundGut-Landmann; co-examiner

2018

2 Summary

The immune system has evolved to defend our body against invading pathogens. Cytokines are small secreted molecules, which are used by the immune system for communication among the different cellular components and are crucial for orchestration of an effective immune response. The family of interleukin (IL)-1 cytokines comprises 11 members, which fulfill manifold functions during inflammation and infection. Among them, IL-1 and IL-36 cytokines share striking similarities in their signaling pathways. Nevertheless, while for IL-1 cytokines a contribution to antimicrobial host defense is well established, the role of IL-36 cytokines in host defense against pathogens remains poorly characterized.

Candida (C.) albicans is a dimorphic and opportunistic fungal pathogen, which can cause infections ranging from mild superficial infections to life-threatening systemic infections, with immunosuppression being a major risk factor for candidiasis. In the work presented in this thesis, the role of IL-36 and IL-1 cytokines in systemic candidiasis in mice was investigated.

The results show a crucial role for IL-36 cytokines in innate antifungal immune responses since the absence of IL-36 receptor (IL-36R) in mice (*Il36r^{-/-}*) resulted in increased disease severity early after infection with *C. albicans*. This was manifested by increased body weight loss and elevated fungal burden in kidney and brain from day 3 post infection on. Interestingly, the well-established antifungal defense mechanisms including pro-inflammatory cytokine production and neutrophil recruitment and neutrophil-mediated fungal killing were not defective in *Il36r^{-/-}* mice. However, the increased fungal burden in the kidney of *Il36r^{-/-}* mice was associated with decreased numbers of MHCII⁺ CD11b^{high} monocyte-derived dendritic cells (moDCs), whereas the recruitment of inflammatory Ly-6C⁺ monocytes was even enhanced. The drastic decrease in the ratio of moDCs to Ly-6C⁺ monocytes in kidney and brain indicates a defect in monocyte-to-moDCs-transition under IL-36R-deficient conditions, or in moDC survival. By means of depletion experiments, CCR2-expressing cells, including monocytes and moDCs, were proven to exhibit protective capacity in systemic *C. albicans* infection. Moreover, criss-cross bone marrow chimera experiments demonstrated that IL-36 cytokines exerted their function predominantly through the action on non-hematopoietic irradiation-resistant cells of

the tissue. In line with this, adoptive transfer of WT bone marrow monocytes showed that expression of *Il36r* by monocytes was not sufficient to confer efficient generation of moDCs in *Il36r*-deficient hosts.

Notably, also IL-1R signaling was of major importance for control of systemic fungal infection. Similarly to IL-36R, IL-1R was not required for a functional neutrophil response, but was crucial for moDC accumulation in infected organs. Furthermore, also IL-1 cytokines were protective by triggering a response of non-hematopoietic tissue cells. Characterization of renal tissue cell subsets identified endothelial cells as most likely recipients of IL-36 and IL-1 cytokine signals. Collectively, our data reveal the importance of the two IL-1 family members IL-1 and IL-36 for the control of systemic fungal infection by induction of protective responses in cells of the non-hematopoietic compartment. In contrast to IL-1- and IL-36-mediated antifungal immunity, CARD9-dependent protection against fungal infection was exclusively conferred by hematopoietic cells.

In a side project, the role of IL-36 cytokines during differentiation of T helper subsets was studied. The experiments showed that IL-36R agonist strongly promote Th17 differentiation, while Th2 development was severely impaired in the presence of IL-36. Furthermore, an IL-36 reporter cell line has been established that sensitively detects IL-36R signals and reports them as eGFP signal. In addition, by the fusion of the extracellular domain of IL-36R with the Fc part of the human IgG1 molecule, a soluble IL-36 receptor (sIL 36R) was generated.

Overall, the data presented in this thesis provide new insights into the role of IL-36 cytokines during innate and adaptive immune processes and show significant parallels between IL-36 and IL-1 cytokines in their protective role against fungal infections.

3 Zusammenfassung

Das Immunsystem hat sich als komplexes, vielschichtiges System entwickelt, um den Körper vor angreifenden Krankheitserregern zu schützen. Die Kommunikation zwischen den einzelnen zellulären Komponenten des Immunsystems ist essentiell für eine effektive und schützende Immunantwort. Zytokine sind kleine Moleküle, die von Immunzellen für genau diesen Zweck der Kommunikation sekretiert werden. Die Familie der Interleukin (IL)-1 Zytokine beinhaltet 11 Mitglieder, die vielfältige Funktionen in der Abwehr von Krankheitserregern und in Entzündungsreaktionen haben. IL-1 Zytokine und IL-36 Zytokine sind Teil der IL-1 Familie und weisen bemerkenswert viele Ähnlichkeiten in ihren Signalwegen auf. Während die Mitwirkung der IL-1 Zytokine an der Abwehrreaktion gegen Pathogene bereits gut studiert und anerkannt ist, ist die Rolle der IL-36 Zytokine in diesem Zusammenhang weitaus weniger verstanden.

Candida (C.) albicans ist ein dimorphes und opportunistisches Pilzpathogen, das beim Menschen Infektionen variierenden Schweregrads auslösen kann – von milder oberflächlicher Hautinfektionen bis zur lebensbedrohlichen systemischen Infektion, wobei Immunsuppression der größte Risikofaktor für *Candida*-Infektionen beim Menschen ist. In der vorgelegten Arbeit wurde die Rolle der IL-36 Zytokine und der IL-1 Zytokine während der systemischen *C. albicans* Infektion im Mausmodell untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass IL-36 Zytokine eine wichtige Rolle für die Pilzabwehr in der Phase der angeborenen Immunantwort spielen, da in der Abwesenheit des IL-36-Rezeptors (IL-36R) in genetisch modifizierten Mäusen (*Il36r^{-/-}*) der Schweregrad der Erkrankung stark erhöht war. Dies zeigte sich in erhöhtem Gewichtsverlust so wie in erhöhten Pilztitern in der Niere und dem Gehirn ab Tag 3 nach der Infektion. Interessanterweise waren wichtige angeborene Abwehrmechanismen wie die Produktion entzündungsfördernder Zytokine sowie die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und das Abtöten von *Candida* durch eben diese in *Il36r^{-/-}* Mäusen nicht beeinträchtigt. Der erhöhte *Candida*-Titer in der Niere war jedoch mit einer verminderten Anzahl von MHCII⁺ CD11b^{high} dendritischen Zellen monozytischen Ursprungs (moDC) verbunden, wohingegen die inflammatorischen Ly-6C⁺ Monozyten vermehrt rekrutiert wurden. Der starke

Rückgang der moDCs im Verhältnis zu den Ly-6C+ Monozyten in der Niere und dem Gehirn weist darauf hin, dass ein Defekt in der Differenzierung der moDCs aus den Monozyten in der Abwesenheit vom IL-36R vorliegt. Mittels Depletions-Experimenten, konnte eine schützende Wirkung von CCR2-exprimierenden Zellen - moDCs und Monozyten einschließlich – in systemischer *C. albicans*-Infektion nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten Experimente mit Criss-Cross-Knochenmarks-Chimären, dass IL-36 Zytokine ihre Funktion vorwiegend durch die Wirkung auf nicht-hämatopoetische bestrahlungsresistente Zellen des Gewebes ausübten. In Übereinstimmung damit zeigte der adoptive Zelltransfer von Monozyten aus dem Knochenmark, dass die Expression von *Il36r* durch Monozyten nicht ausreichend war, um ihre Reifung zu moDCs in *Il36r*-defizienten Wirten zu gewähren.

Bemerkenswerterweise war auch der IL-1R-Signalweg von großer Bedeutung für das in Schach halten der systemischen Pilzinfektion. Ähnlich wie der IL-36R war der IL-1R für eine intakte Neutrophilen-Antwort nicht erforderlich, aber für die Anreicherung von moDCs in infizierten Organen entscheidend. Darüber hinaus waren auch die IL-1 Zytokine schützend, indem sie eine Antwort von nicht-hämatopoetischen Gewebezellen auslösten. Die Charakterisierung von Nierengewebszellen ergab, dass die Endothelzellen die wahrscheinlichsten Empfänger von IL-36- und IL-1-Zytokinsignalen darstellen. Zusammenfassend zeigen unsere Daten die Bedeutung der beiden IL-1-Familienmitglieder IL-1 und IL-36 für die Bekämpfung von systemischer Pilzinfektion hervor. Beide induzieren eine von schützende Antworten in Zellen des nicht-hämatopoetischen Kompartiments. Im Gegensatz zur IL-1- und IL-36-vermittelten Immunität wurde der CARD9-abhängige Schutz gegen Pilzinfektion ausschließlich durch hämatopoetische Zellen verliehen.

In einem Nebenprojekt wurde die Rolle von IL-36-Zytokinen während der Differenzierung von T-Helferzellen untersucht. Die Experimente zeigten, dass IL-36R-Agonisten die Th17-Differenzierung stark fördert, während die Th2-Entwicklung in Gegenwart von IL-36 stark beeinträchtigt war. Darüber hinaus wurde eine IL-36-Reporterzelllinie etabliert, die IL-36R Signale hochsensitiv erkennt und als eGFP-Signal anzeigt. Außerdem wurde durch die Fusion der extrazellulären Domäne

des IL-36R mit dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Moleküls ein löslicher IL-36 Rezeptor (sIL-36R) hergestellt.

Insgesamt liefern die in dieser Arbeit vorgestellten Daten neue Einblicke in die Rolle von IL-36-Zytokinen für die Prozesse der angeborenen und der adaptiven Immunantwort und zeigen erhebliche Parallelen zwischen IL-36 und IL-1 Zytokinen in ihrer schützenden Rolle gegen Pilzinfektionen.