

DISS. ETH NO. 26524

Redox Metabolism of Innate and Adaptive Immunity

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

Presented by

JONATHAN ROBERTO MURI

MSc ETH Biology, ETH Zurich

Born on 02.07.1990

Citizen of Schötz (LU)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Manfred Kopf; examiner

Prof. Dr. Nicola Zamboni; co-examiner

Prof. Dr. Edward Pearce; co-examiner

2020

1 SUMMARY

Aerobic organisms are continuously exposed to reactive oxygen species (ROS) during their lifetime. Originally, ROS were thought to exclusively possess detrimental functions and play a major role in the acceleration of the ageing process by oxidizing and damaging cellular biomolecules. However, more recently it has been widely appreciated that ROS are much more than harmful compounds and in fact regulate several physiological cellular processes such as proliferation, differentiation and cell signalling. Indeed, aerobic organisms have developed a sophisticated network of antioxidant proteins that maintains ROS homeostasis in the cell by minimizing their harmful effects while at the same time allowing their cellular functionality at low concentrations. In this PhD work, we aimed at understanding the role of two main antioxidant systems, namely the thioredoxin (Trx) and the glutathione (GSH) systems, in the development, maintenance and responses of various immune cells. Moreover, we investigated how these antioxidant pathways dictate and regulate immune metabolic changes during quiescence and activation.

We first studied the requirement of the cytosolic Trx1 system in the development and responses of T and B lymphocytes. Our work has revealed that T cells utilize the Trx1 pathway to provide reducing equivalents for the synthesis of DNA building blocks by ribonucleotide reductase at the last step of the pentose phosphate pathway (PPP). Thus, the Trx1 system has a crucial role in the metabolic reprogramming of T cells when they switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis upon activation to satisfy their increased metabolic demands, including the synthesis of new DNA building blocks. Importantly, while T cells are absolutely dependent on the Trx1 system for efficient expansion, we revealed that B cells with a compromised thioredoxin system rearrange their redox system and utilize the GSH/glutaredoxin (Grx)-1 pathway to maintain normal development and immune responses. Thus, these findings may have profound implications for therapies of B and T cell neoplasms.

In a follow-up study, we have investigated the requirement of the Trx1 system in myeloid cells. In contrast to T cells and similar to B cells, we found that the Trx1 pathway is

SUMMARY

dispensable for myeloid cell haematopoiesis due to their capacity to tap the glutathione/glutaredoxin pathway for DNA biosynthesis. Moreover, we have also identified an inflammatory function of the Trx1 system in dendritic cells and macrophages. Indeed, dendritic cells utilize the reducing power of the Trx1 system to enable nuclear factor- κ B (NF- κ B) DNA-binding for transcription of pro-inflammatory cytokines. In contrast, macrophages require the Trx1-dependent ROS scavenging activity for NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β secretion. Consistently, we found that the Trx1 pathway is also important for enabling classical activation of M1 macrophages, likely due to its role in fueling the PPP. Surprisingly, we additionally observed that the thioredoxin-interacting protein (Txnip) is not essential for NLRP3 activation as previously proposed. Therefore, these results suggest that therapeutically targeting Trx1 may be exploited to treat inflammatory diseases.

To further expand on the function of antioxidant proteins in immune cells, we next investigated the requirement of lipid peroxide scavenger glutathione peroxidase (Gpx)-4 in B cells. Our group has previously demonstrated that Gpx4 is absolutely essential for T-cell immunity. Interestingly, we here found that similar to T cells, also innate-like B cells, namely the B1 and marginal zone (MZ) B-cell populations, strictly rely on the Gpx4 function of scavenging lipid peroxides and preventing ferroptosis. Surprisingly, however, follicular B2 cells develop normally, undergo functional germinal center reactions and mount antibody responses in the absence of Gpx4. We found that the differential requirement of Gpx4 in follicular B2 cells and innate-like B cells is dictated by the high lipid metabolism related to the proliferation and function of innate-like B cells, which in the absence of Gpx4 accumulate lipid ROS and undergo ferroptosis. Altogether, these results show how the antioxidant protein Gpx4 is differentially required based on the metabolic features of B1 and MZ B cells, that is the high fatty acid uptake and metabolism.

Since ROS can oxidize various biomolecules, we have finally studied how lipid oxidations in particular regulate inflammatory responses. The outcomes of lipid oxidation are very controversial in the field, since both anti- and pro-inflammatory activities have been proposed. Trying to reconcile the field, we utilized oxidized phospholipids and

SUMMARY

cyclopentenone-containing prostaglandins (e.g.15d-PGJ2), and investigated their effects on macrophage- and dendritic cell-mediated inflammatory responses. Interestingly, we found that exposure of dendritic cell/macrophages to low concentrations of such lipids instigated an anti-inflammatory response mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-dependent inhibition of NF- κ B activation. In contrast, high concentrations of these lipid species provided after Toll-like receptor (TLR) activation resulted in inflammatory apoptosis characterized by caspase-8-mediated IL-1 β maturation independent of the classical inflammasome pathway. Our results thus uncover an unexpected pro- and anti-inflammatory activity of physiologically-relevant oxidized lipid products which is dependent on the concentration, a phenomenon known as hormesis.

Overall, the work presented in this PhD thesis sheds light on the function of various antioxidant proteins in the regulation of immunity and metabolic changes that dictate immune cell function. Moreover, it additionally highlights the role of lipid oxidation in regulating inflammatory responses of dendritic cells and macrophages, which may occur *in vivo* during oxidative stress conditions.

2 RIASSUNTO

Gli organismi aerobi sono quotidianamente esposti alle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Originariamente, i ROS sono stati associati a effetti dannosi, come ad esempio l'ossidazione ed il conseguente danneggiamento di varie biomolecole quali proteine, lipidi e acidi nucleici, ed inoltre venivano considerati responsabili del processo d'invecchiamento cellulare. Tuttavia, si è successivamente compreso che i ROS sono molto più che molecole con effetti esclusivamente nocivi; infatti, sono coinvolti nella regolazione di diversi processi fisiologici, quali la proliferazione, la differenziazione e la segnalazione cellulare. Gli organismi aerobi hanno quindi sviluppato una sofisticata rete di proteine antiossidanti per mantenere l'omeostasi dei ROS nella cellula, da un lato impedendone l'accumulo e di conseguenza evitandone gli effetti dannosi, dall'altro assicurandone una minima concentrazione tale da permettere lo svolgimento delle funzioni cellulari. In questo lavoro di dottorato, si è studiato il ruolo dei due principali sistemi antiossidanti - il sistema della tioredossina (Trx) e del glutatione (GSH) - nello sviluppo, nell'omeostasi, e nelle risposte di varie cellule immunitarie. Inoltre, si è voluto comprendere come questi sistemi antiossidanti inducano e regolino i cambiamenti metabolici nelle cellule immunitarie durante l'omeostasi e a seguito dell'incontro con agenti patogeni.

Nel primo progetto, si è investigato il ruolo del sistema citosolico Trx1 nello sviluppo e nelle risposte immunitarie dei linfociti T e B. Il nostro lavoro ha dimostrato che le cellule T utilizzano il sistema Trx1 per alimentare con equivalenti riducenti la sintesi del DNA nell'ultima reazione della via dei pentoso-fosfati (PPP) catalizzata dalla ribonucleotide reductasi. Questo ha quindi rivelato un ruolo fondamentale del sistema Trx1 nella riprogrammazione metabolica delle cellule T durante il loro passaggio dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi aerobica. Questo è fondamentale per soddisfare l'enorme esigenza metabolica, come ad esempio quella della sintesi di nuovi nucleotidi. Inoltre, mentre le cellule T richiedono necessariamente un sistema Trx1 funzionale, si è osservato che le cellule B con un sistema Trx1 compromesso hanno invece la capacità di riorganizzare il loro sistema redox e quindi utilizzare il GSH e la glutaredossina (Grx)-1 come sostituti durante il loro sviluppo e le loro risposte immunitarie. Dunque questi

risultati potrebbero avere profonde implicazioni nelle terapie per combattere i neoplasmi generati dalle cellule B e T.

Continuando il precedente studio, si è poi studiato il ruolo del sistema Trx1 nelle cellule mieloidi. A differenza delle cellule T e analogamente alle cellule B, si è scoperto che la proteina Trx1 è indispensabile per il processo di ematopoiesi delle cellule mieloidi, data la loro capacità di indurre la via redox del GSH e della Grx1 per sostenere la sintesi del DNA. Inoltre, si è identificata una funzione infiammatoria del sistema Trx1 nelle cellule dendritiche e nei macrofagi. Infatti, le cellule dendritiche utilizzano la capacità riducente del sistema Trx1 per permettere l'interazione tra il fattore nucleare- κ B (NF- κ B) e il DNA, facilitando quindi la trascrizione di citochine pro-infiammatorie. A differenza delle cellule dendritiche, i macrofagi necessitano l'azione antiossidante del sistema Trx1 per eliminare i ROS e permettere l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 per la secrezione di IL-1 β . Inoltre, si è scoperto che Trx1 possiede anche una funzione nella classica attivazione dei macrofagi M1, probabilmente dovuta al suo ruolo nel sostenere la PPP. È stato precedentemente proposto che la proteina che interagisce con Trx1 (Txnip) è essenziale per l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3; tuttavia, i nostri risultati dimostrano un ruolo indispensabile di Txnip. Dunque, questo lavoro suggerisce che delle terapie contro Trx1 potrebbero essere impiegate con successo nel trattamento di malattie infiammatorie.

Per comprendere al meglio la funzione delle proteine antiossidanti nelle cellule immunitarie, si è successivamente studiato il ruolo della glutatione perossidasi (Gpx)-4 nelle cellule B. Il nostro gruppo di ricerca aveva precedentemente dimostrato che Gpx4 è essenziale per l'immunità mediata dai linfociti T. In questo lavoro di dottorato, si è osservato che, analogamente alle cellule T, anche le cellule B innate, ossia i linfociti B cella zona marginale (cellule MZ B) e le cellule B1, dipendono fortemente dalla funzione di Gpx4 per neutralizzare i perossidi dei lipidi e prevenire la ferroptosi. Sorprendentemente, si è però scoperto che le cellule follicolari B2 sono in grado di svolgere normalmente il loro processo di sviluppo, come pure le reazioni nel centro germinale e la produzione di anticorpi in assenza di Gpx4. Si è dimostrato che questa importante differenza tra le cellule follicolari B2 e le cellule B innate è dovuta al fatto che

quest'ultime possiedono un intenso metabolismo lipidico per sostenere la loro proliferazione e svolgere le loro funzioni cellulari. In assenza di Gpx4, le cellule B innate accumulano ROS lipidici e muoiono conseguentemente per ferroptosi. Questi risultati dimostrano quindi che la proteina antiossidante Gpx4 è necessaria per sostenere le funzioni metaboliche delle cellule B1 e MZ B, come l'elevato utilizzo di acidi grassi.

Infine, dato che i ROS possono ossidare varie biomolecole, si è studiato come l'ossidazione dei lipidi in particolare regola le risposte infiammatorie. Gli effetti delle ossidazioni lipidiche sono particolarmente controversi nella letteratura, poiché sono stati riscontrati sia effetti pro- che anti-infiammatori. Cercando di far chiarezza, sono stati utilizzati fosfolipidi ossidati e prostaglandine contenenti ciclopentenoni, come ad esempio 15d-PGJ2, e se ne è studiato il loro effetto nella regolazione delle risposte infiammatorie mediate dalle cellule dendritiche e dai macrofagi. Si è scoperto che l'esposizione di queste cellule a basse concentrazioni lipidiche induce una risposta anti-infiammatoria mediata dal fattore nucleare eritroide-2 (Nrf2), in grado di inibire l'attivazione di NF- κ B. Al contrario, alte concentrazioni di queste specie lipidiche, aggiunte dopo la stimolazione di recettori Toll-simili (TLR), scatenano l'apoptosi infiammatoria caratterizzata dalla maturazione di IL-1 β da parte della caspasi-8, indipendentemente dalla classica attivazione dell'inflammasoma. I nostri risultati, dunque, indicano che un determinato prodotto lipidico ossidato può agire sia in modalità pro- che anti-infiammatoria a dipendenza della sua concentrazione, un fenomeno conosciuto come ormesi.

Riassumendo, il lavoro di dottorato presentato di seguito fa luce sulle funzioni di varie proteine antiossidanti, e del modo in cui queste regolano le risposte immunitarie e i cambiamenti metabolici che dettano diverse funzioni cellulari. Inoltre, evidenzia il ruolo delle ossidazioni lipidiche nella regolazione delle risposte infiammatorie da parte di cellule dendritiche e macrofagi, che potrebbero verificarsi in condizioni di stress ossidativo.