

Bacterial Sensing in the Intestinal Mucosa and Consequences Thereof

Doctoral Thesis

Author(s):

Hausmann, Annika

Publication date:

2020-09

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000454005>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 27102

Bacterial Sensing in the Intestinal Mucosa and Consequences Thereof

A Thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR of SCIENCE ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Annika Hausmann

M. Sc. Molecular Medicine, Universität Freiburg

Born May 1989 in Cologne

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Dr. Mikael Sellin

Prof. Dr. Kevin Maloy

Dr. Roman Spörri

2020

SUMMARY

The innate immune system confers fast protection from pathogenic threats. To achieve this task, it relies on invariant pattern recognition receptors (PRRs), which bind conserved microbe-associated patterns. At systemic sites, which are naturally devoid of bacteria, inflammation efficiently clears microbial intruders upon detection. By contrast, the intestinal mucosa represents an interesting exception. Its localization at the interface between the sterile host body compartment and the intestinal lumen containing high densities of commensal bacteria requires specific regulatory mechanisms to ensure peaceful coexistence with the commensal microbiota, and protection from enteropathogens at the same time. To date, it remains incompletely understood how the regulation of bacterial sensing in the intestinal mucosa facilitates the differentiation between pathogenic and commensal bacteria.

In this work, I have employed the model enteropathogen *Salmonella* Typhimurium (*S. Tm*) to probe and dissect innate immune responses in the intestinal mucosa, focusing on the roles of the PRRs TLR4 and NLRC4.

I found that intestinal epithelial cells (IECs) in the adult, homeostatic mucosa do not directly sense LPS via TLR4 and instead form an extracellular LPS-inert physical barrier to prevent bacterial translocation into the lamina propria. Sentinel CD11b⁺ CD103⁻ mononuclear phagocytes, by contrast, stretch out in the intercrypt lamina propria underneath the epithelium and react swiftly with TNF production upon TLR4 stimulation. This induces localized epithelial NFκB activation, which results in the secretion of direct epithelial immune effectors such as C3 and Reg3γ, and of chemokines for the recruitment of immune cells.

Previous work established the NAIP/NLRC4 inflammasome as an important epithelial-intrinsic protection for the restriction of mucosal *S. Tm* loads by expulsion of infected IECs. *Nlrc4*^{-/-} mice also carry increased *S. Tm* loads in their mLN. Immune cell NAIP/NLRC4 was implicated in the restriction of intracellular pathogens before, which suggested that immune cells might be responsible for this systemic NAIP/NLRC4-mediated protection. By contrast, *S. Tm* evades immune cell NAIP/NLRC4 detection by rapid downregulation of the NAIP/NLRC4 ligands flagella and TTSS-1 upon entry into the intestinal mucosa. Therefore, while immune cell NAIP/NLRC4 has a protective potential to restrict intracellular *S. Tm* replication, *S. Tm* evades this restriction. The necessity of the flagella and TTSS-1 for epithelial invasion, by contrast, prevents the evasion of epithelial NAIP/NLRC4 recognition and therefore positions IECs ideally for the NAIP/NLRC4-mediated restriction of mucosal *S. Tm* loads. NAIP/NLRC4-mediated expulsion of infected IECs consequently controls the migration of *S. Tm* to systemic sites and ultimately protects from increased systemic pathogen loads.

The two PRRs analyzed here fulfill their protective functions in compartments of the intestinal mucosa, which are usually devoid of bacteria: the lamina propria (TLR4) and the host cell cytosol (NLRC4). In conclusion, they employ the pathogen-associated feature of invasiveness to differentiate between commensal and harmful bacteria. The equipment of physiologically bacteria-free compartments of the mucosa with PRRs thereby enables the detection of enteropathogen invasion and/or sensing of barrier malfunctions while preventing immune activation by commensals.

Finally, I have assessed the potential of organoids as an *ex vivo* model to assess IEC physiology and function. Recently, intestinal epithelial organoids have emerged as a relevant model system. In the presented work, I have validated organoids as a realistic, reproducible model for IECs *in vivo*, and I have shown that their physiology in homeostasis and upon TNF stimulation is largely independent of donor-derived microbiota imprints. This will be the basis for future mechanistic work on the role of IECs in pathogen defense.

Several features complicate the analysis of host-microbe interactions in the intestine: i) their complex, reciprocal spatiotemporal kinetics, ii) the sensitivity to microbiota changes, and iii) the need for good model systems to identify and quantify the contribution of specific cell types to host-microbe interactions. In the presented work, I discuss the applicability of mechanistic mathematical models in combination with genetic tagging approaches to decipher the complex interactions of host-microbe relationships and emphasize the importance of *in vivo* models to confirm the relevance of identified mechanisms. Furthermore, I discuss the importance of controlling for microbiota differences by the use of wild type littermate controls for transgenic mice.

My findings advance our understanding of bacterial sensing in the intestinal mucosa during *S. Tm* infection and establish versatile *in vivo* and *ex vivo* systems for assessing the contributions of different cell types to host-microbe crosstalk. This is an important step towards deciphering the complex network which regulates intestinal homeostasis and protects the intestinal mucosa from bacterial infection.

ZUSAMMENFASSUNG

Das angeborene Immunsystem bietet einen schnell reagierenden Schutz vor pathogenen Bedrohungen. Die Basis dafür sind Mustererkennungsrezeptoren, die konservierte, mikrobe-assoziierte Strukturen erkennen. In systemischen Organen des Wirts, die physiologisch keine Bakterien enthalten, können bakterielle Eindringlinge somit schnell und effizient durch eine Immunantwort eliminiert werden. Die Darmmukosa stellt dagegen eine interessante Ausnahme dar. Ihre Lokalisation zwischen dem sterilen Wirts-Kompartiment und dem mit kommensalen Bakterien gefüllten Darmlumen erfordert spezifische regulierende Mechanismen, um eine friedliche Koexistenz mit der Mikrobiota bei gleichzeitigem Schutz vor Enteropathogenen zu ermöglichen. Bis heute ist nicht vollständig verstanden, wie die Regulation von bakterieller Detektion in der Darmmukosa die Unterscheidung von kommensalen und pathogenen Bakterien ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit habe ich das Modellenteropathogen *Salmonella* Typhimurium (*S. Tm*) verwendet, um angeborene Immunantworten in der Darmmukosa zu aktivieren und ihre Komponenten zu analysieren. Dabei habe ich mich auf die Mustererkennungsrezeptoren TLR4 und NLRC4 fokussiert.

Ich habe herausgefunden, dass Darmepithelzellen in der adulten, homöostatischen Darmmukosa LPS nicht direkt über TLR4 detektieren. Im Gegenteil bilden sie eine physikalische, für extrazelluläres LPS inaktive, Barriere, um bakterielle Invasion in die Lamina Propria zu verhindern. Stattdessen ist die Darmmukosa mit CD11b⁺ CD103⁻ mononukleären Wächterphagozyten ausgestattet, die ausgestreckt in der Lamina Propria zwischen den Krypten in unmittelbarer Nähe zum Epithel liegen. Diese reagieren schnell mit der Produktion von TNF auf die Stimulation mit LPS. Dies führt zu einer lokalen Aktivierung des NFκB-Signalwegs in Darmepithelzellen, die daraufhin direkte Immuneffektoren wie C3 und Reg3γ sekretieren sowie Chemokine, um Immunzellen zu rekrutieren.

Vorherige Studien haben NAIP/NLRC4 als einen wichtigen, epithel-intrinsischen Schutzeffektor identifiziert, der eine mukosale *S. Tm* Akkumulation durch das Ausstoßen infizierter Darmepithelzellen aus dem Epithelverband verhindert. *Nlrc4*^{-/-} Mäuse haben nicht nur erhöhte Pathogenlasten in der Darmmukosa, sondern auch in den mesenterischen Lymphknoten. Immunzell-NAIP/NLRC4 soll auch eine Rolle in der Kontrolle intrazellulärer Pathogene spielen und könnte dementsprechend in diese systemische Kontrolle der Pathogenlast involviert sein. *S. Tm* reguliert allerdings die Expression von Flagellen und dem Typ-Drei-Sekretionssystem - den Molekülen die durch NAIP/NLRC4 erkannt werden - herunter, sobald sie die Darmmukosa invadiert haben. Dadurch verhindert *S. Tm* die Detektion durch Immunzellen, obwohl diese durchaus das Potential haben, *S. Tm* über NAIP/NLRC4 zu detektieren. Die Notwendigkeit für *S. Tm*, Flagellen und das Typ-3-Sekretionssystem für die Invasion in Darmepithelzellen zu exprimieren, verhindert dagegen das Ausweichen der Detektion durch epitheliales NAIP/NLRC4 und positioniert die Darmepithelzellen ideal für eine effiziente Detektion von *S. Tm*. Das Ausstoßen infizierter Darmepithelzellen über NAIP/NLRC4 kontrolliert dadurch die systemische Migration von *S. Tm* und schützt somit letztlich vor hohen systemischen Pathogenlasten.

Die beiden hier analysierten Mustererkennungsrezeptoren führen ihre schützenden Funktionen in Kompartimenten der Mukosa aus, die physiologisch frei von Bakterien sind: die Lamina Propria (TLR4) und das Zytosol von Wirtszellen (NLRC4). Sie nutzen also die Pathogen-assoziierte Eigenschaft der Invasion als

Unterscheidungsmerkmal zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien. Die Ausrüstung von physiologisch bakterienfreien Kompartimenten der Darmmukosa mit Mustererkennungsrezeptoren ermöglicht somit die Detektion von Enteropathogen-Angriffen und/oder Barrieredefekten und verhindert gleichzeitig eine Immunaktivierung durch kommensale Bakterien.

Schlussendlich habe ich das Potential von Organoiden als *ex vivo* Modell zur Untersuchung von Epithelzellphysiologie und -funktion analysiert. Darmepithelorganoide etablieren sich mehr und mehr als relevantes Modellsystem. In der vorliegenden Arbeit habe ich Organoide als realistisches, reproduzierbares Modell validiert, dessen Physiologie in Homöostase und nach TNF Stimulation weitgehend unabhängig von der Mikrobiota der Donoren ist. Dies ist die Basis für die zukünftige, mechanistische Untersuchung der Rolle von Darmepithelzellen in der Interaktion mit Mikroben.

Mehrere Eigenschaften erschweren die Analyse von Wirt-Bakterien Interaktionen im Darm: i) ihre komplexe, reziproke raumzeitliche Kinetik, ii) die Sensitivität für Veränderungen der Mikrobiota, und iii) der Bedarf an guten Modellsystemen, die die Identifizierung und Quantifizierung der Beiträge verschiedener Zelltypen zu Immunantworten erlauben. In der vorliegenden Arbeit diskutiere ich die Anwendbarkeit von mechanistischen mathematischen Modellen in Kombination mit neutralen genetischen Markierungen, um die komplexen Zusammenhänge in Wirt-Bakterien Interaktionen zu entziffern, und betone die Wichtigkeit von *in vivo* Modellen, um die Relevanz identifizierter Mechanismen zu bestätigen. Desweiteren diskutiere ich die Wichtigkeit der Kontrolle von Mikrobiota-Unterschieden in transgenen Mäusen durch Wildtypgeschwister.

Meine Erkenntnisse erweitern das Verständnis der bakteriellen Detektion in *S. Tm* Infektionen, und etablieren vielseitige *in vivo* und *ex vivo* Modelle zur Identifikation des Beitrages von verschiedenen Zelltypen zur Kommunikation zwischen Wirt und Mikroben. Dies ist ein wichtiger Schritt zur Entzifferung des komplexen Netzwerkes, das Darmhomöostase und den Schutz vor bakteriellen Infektionen ermöglicht.