

# ULK1/2 dependent and independent mechanisms in myeloid cell-mediated defense against *Listeria monocytogenes*

Alina Farid

## Summary

The intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* (L.m.) is targeted by a non-canonical autophagy pathway called LC3-associated phagocytosis (LAP). A hallmark of LAP is the recruitment of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) directly to the L.m.-containing phagosome, which depends on production of reactive oxygen species (ROS) by the NADPH oxidase 2 (Nox2) and substantially contributes to anti-listerial activity of tissue-resident macrophages. We here show that bone marrow-derived macrophages (BMDM) fail to induce LAP of L.m. due to insufficient ROS production by Nox2 and instead target L.m. by pore-forming toxin-induced, non-canonical autophagy (PINCA), which depends on the listerial pore-forming toxin Listeriolysin O (LLO). Similar to LAP, PINCA was also completely independent of the autophagy pre-initiation complex components ULK1/2. However, deficiency for ULK1/2 in myeloid cells (Ulk1/2<sup>MYEL-KO</sup>) led to increased susceptibility of mice towards infection with L.m.. Ulk1/2<sup>MYEL-KO</sup> mice showed signs of increased neutrophil turnover as indicated by elevated neutrophil recruiting chemokines RANTES/CCL5 and Gro- $\alpha$ -KC and increased percentages of neutrophils in the peritoneal cavity. Further, ULK1/2-deficiency in myeloid cells caused increased cell death of peritoneal cells, which was accompanied by elevated ROS production and pronounced systemic inflammation. Finally, myeloid deficiency for ULK1/2 resulted in increased bacterial burden in the organs of L.m.-infected mice, and reduced survival at day 3 post infection. Moreover, *in vitro*, we found that Ulk1/2-deficient peritoneal macrophages (PM) failed to restrict intracellular replication of L.m. despite normal LAP function and even increased ROS production. Remarkably, Ulk1/2-deficient PM showed increased secretion of RANTES *in vitro*, underlining the observed increased neutrophil infiltration into the peritoneal cavity *in vivo*. Together, our findings highlight the importance of the autophagy kinase ULK1/2 in myeloid-cell mediated immunity in murine listeriosis.

## Zusammenfassung

Das intrazelluläre Pathogen *Listeria monocytogenes* (L.m.) wird von einer nicht-kanonischen Form der Autophagie, die als LC3-assoziierte Phagozytose (LAP) bezeichnet wird, getargeted. Ein Merkmal der LAP ist die Rekrutierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1 Leichtkette 3 (LC3) direkt zum L.m.-enthaltenden Phagosom, die durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH-Oxidase 2 (Nox2) aktiviert wird und wodurch die anti-listerielle Aktivität von Makrophagen deutlich verbessert wird. Diese Arbeit zeigt, dass Knochenmarksmakrophagen (BMDM), aufgrund einer unzureichenden ROS-Produktion, nicht in der Lage sind LAP zu induzieren und stattdessen L.m. durch eine Poren-formendes Toxin-induzierte, nicht-kanonische Autophagie (PINCA) targeten, die durch das Poren-formende Toxin der Listerien (LLO) induziert wird. Vergleichbar mit der LAP, ist PINCA ebenfalls unabhängig von den Autophagie-Präinitiationskomplex-Komponenten ULK1/2. Nichtsdestotrotz führte eine Defizienz für ULK1/2 in myeloiden Zellen (Ulk1/2<sup>MYEL-KO</sup>) zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer L.m.-Infektion. Ulk1/2<sup>MYEL-KO</sup> Mäuse hatten Anzeichen für einen erhöhten Neutrophilenumsatz, was durch ein höheres Level an Neutrophil-rekrutierenden Chemokinen RANTES/CCL5 und Gro- $\alpha$ -KC und einer größeren Neutrophilen-Population in der Peritonealhöhle angedeutet wurde. Darüber hinaus resultierte eine Defizienz für ULK1/2 in myeloiden Zellen in erhöhtem Zelltod der Peritonealzellen, was mit einer gesteigerten ROS-Produktion und einer überbordenden, systemischen Entzündungsreaktion einherging. Letztendlich führte eine Defizienz für ULK1/2 in myeloiden Zellen zu einer höheren Bakterienlast in den Organen der infizierten Mäuse und einer geringeren Überlebensrate an Tag 3 nach Infektion. Des Weiteren konnten Ulk1/2-defiziente Peritonealmakrophagen (PM) die intrazelluläre Vermehrung von Listerien, trotz normal-funktionierender LAP und einer gesteigerten ROS-Produktion, nicht eindämmen. Bemerkenswerterweise haben Ulk1/2-defiziente PM ebenfalls eine erhöhte RANTES Sezernierung *in vitro* gezeigt, was die erhöhte Neutrophilinfiltration in die Peritonealhöhle *in vivo* widerspiegelt. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Bedeutung der Autophagiekinase ULK1/2 in der von myeloiden Zellen vermittelten Immunität bei Listeriose in Mäusen.