

## Samenvatting

Het immuunsysteem is een complex netwerk van verdedigingsmechanismen, die ons in staat stellen om ziekteverwekkers, zoals bacteriën, virussen en parasieten, op een effectieve manier te bestrijden. Deze verdedigingsmechanismen omvatten een assortiment aan gespecialiseerde cellen, de witte bloedcellen, alsmede afweerstoffen die zich in het bloedplasma bevinden. Bij vertebraten (gewervelde dieren), waar ook de mens toe behoort, worden deze verdedigingsmechanismen traditioneel ingedeeld in het aangeboren of innate immuunsysteem en het verworven of adaptieve immuunsysteem. Het innate immuunsysteem is evolutionair gezien het oudste en is aanwezig in zowel ongewervelde als gewervelde dieren. Het adaptieve immuunsysteem maakte pas met het ontstaan van de kraakbeenvissen, bijna 450 miljoen jaar geleden, zijn entree.

In de afgelopen jaren heeft in het bijzonder de studie naar het innate immuunsysteem aan populariteit gewonnen. Dit was het gevolg van de ontdekking van een aantal receptorfamilies die essentieel zijn voor het herkennen van een breed spectrum van ziekteverwekkers door witte bloedcellen. Onderzoek heeft uitgewezen dat het innate immuunsysteem de primaire verdedigingslinie van het organisme tegen pathogene micro-organismen vormt en bovendien een belangrijke rol speelt bij het instrueren van het adaptieve immuunsysteem. Diverse moleculaire mechanismen die aan de functionele basis van het innate immuunsysteem staan, zijn inmiddels onttraf. Microbiële indringers worden in het organisme herkend door receptoren die bekend staan als patroon-herkende receptoren (pattern recognition receptors). Tot deze groep van receptoren worden onder meer de families van Toll-receptoren (Toll-like receptors, TLRs), NOD-receptoren en RIG-receptoren gerekend. Deze receptoren zijn in staat om geconserveerde moleculaire structuren te herkennen die specifiek zijn voor micro-organismen. Kleinschalige mutaties in de genen, die coderen voor deze receptoren of de daarmee geassocieerde signaalmoleculen, leiden tot een verhoogde vatbaarheid voor infectieziekten of inflammatoire aandoeningen. Verder is aangetoond, dat zowel extracellulaire als ook intracellulaire ziekteverwekkers in staat zijn om de immunoreactie van de gastheer zodanig te manipuleren dat zij niet meer door de gastheer te detecteren zijn. Dit benadrukt tevens de klinische relevantie van fundamenteel onderzoek naar het innate immuunsysteem.

In het hier voorliggende proefschrift ligt de nadruk op het gebruik van het zebrafisembryo als modelsysteem voor de studie van het immuunsysteem van vertebraten, met als doel nieuwe inzichten te verkrijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de innate immunoreacties bij bacteriële infecties. Met name is gekeken naar de functie van de Toll-receptor-signaaltransductieroute tijdens deze infectieprocessen. Het zebrafisembryo is een uitermate geschikt model voor de studie van het innate immuunsysteem, omdat het in de eerste weken van de ontwikkeling geen functioneel adaptief immuunsysteem bezit en daarom geheel afhankelijk is van het innate immuunsysteem. Dit zorgt ervoor, dat men puur naar de effecten van

het innate immuunsysteem kan kijken, zonder invloed van het adaptieve immuunsysteem. Bovendien is de genetische code van de zebravis bekend en zijn manipulaties van het genoom mogelijk. Verder is het embryo doorzichtig, wat het volgen van immuuncellen in het lichaam van een levend embryo, alsmede het bestuderen van de interactie met pathogenen, mogelijk maakt.

Aan het begin van mijn onderzoeksproject was nauwelijks iets bekend over de functie van Toll-receptoren in het zebravisembryomodel. Voorafgaande studies hadden aangetoond, dat de genen voor zowel de Toll-receptoren als ook voor belangrijke TLR-adaptiereiwitten in de zebravis aanwezig waren. Bacteriële infecties leidden tot een verhoogde expressie van deze genen, hetgeen een eerste indicatie voor een geconserveerde functie van de Toll-receptoren gaf. Bovendien was destijds al bekend, dat één-dag-oude embryo's leukocyten (immuuncellen) bezitten, die in staat zijn bacteriën te fagocyteren. Echter, er was nog geen functioneel bewijs dat de rol van TLRs tijdens een infectie, of het bestaan van een innate immunreactie, kon onderbouwen.

Om die reden hebben wij, zoals in **Hoofdstuk 2** staat beschreven, in eerste instantie functioneel onderzoek gedaan naar de rol van MyD88, een essentieel adaptiereiwit in de Toll-receptor-signaalroute, alsmede in de signaalroutes van de interleukin-1 en -18-receptoren. Het uitschakelen van Myd88 (knock-down) met behulp van morpholino's resulteerde in een sterk verhoogde vatbaarheid van het embryo voor infectie met een zwak pathogene stam van *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*). Hiermee hebben wij voor het eerst aangetoond, dat de signaaltransductieroutes die via Myd88 lopen een zeer belangrijke bijdrage leveren aan de immunafweer van het zebravisembryo bij bacteriële infecties. In overeenstemming met onze resultaten, is ook voor MyD88-deficiënte (*MyD88<sup>-/-</sup>*) muizen een significant verhoogde vatbaarheid voor verschillende infectieziekten beschreven. Deze resultaten ondersteunen dat het zebravisembryo een valide model is voor de studie van TLR-sigtaaltransductieprocessen in het innate immuunsysteem van vertebraten.

In **Hoofdstuk 3** hebben wij ernaar gestreefd, om de afweerreactie van het aangeboren immuunsysteem van het zebravisembryo op een systemische bacteriële infectie in kaart te brengen. Hiertoe hebben wij middels microarray-technologie gekeken naar de verschillen in het transcriptoom van met *Salmonella* geïnfecteerde zebravisembryo's ten opzichte van niet-geïnfecteerde embryo's. De zebravisembryo's werden geïnfecteerd met een sterk pathogene en een zwak pathogene (Ra) stam van *Salmonella* en de reactie van de embryo's op deze twee stammen werd gedurende 24 uur vergeleken. De transcriptoom-analyse bracht specifieke patronen van genexpressie over de duur van de infectie aan het licht, welke sterk gecorreleerd waren met de ziekteverschijnselen van de embryo's. Het grootste verschil in de immunreactie op de twee stammen was 24 uur na infectie aantoonbaar. Op dat moment waren de embryo's er in geslaagd de infectie met de zwak pathogene (Ra) stam op te ruimen, terwijl de infectie met de pathogene stam aan intensiteit toenam en rond 30 uur na infectie tot 100% letaliteit leidde.

Vervolgens hebben wij onze resultaten vergeleken met data van infectiestudies in humane cellijnen. Een aanzienlijk gedeelte van de genen die gemeenschappelijk in alle humane cellijnen op infecties reageerden, kwam overeen met de genen die wij in de zebravisembryo's hebben ontdekt. Voorbeelden zijn interferonen, pro- en anti-inflammatoire cytokinen en chemokinen. Tevens was er overlap tussen zebravisembryo's en humane cellen in de expressie van verschillende transcriptiefactoren, receptoren en eiwitten die een rol spelen bij remodelering van het weefsel. Hiermee demonstreren onze resultaten de grote voorspellende waarde van het zebravis-infectiemodel.

In het verdere verloop van het onderzoek hebben wij onze aandacht gericht op de analyse van de TLR-sigtaaltransductieprocessen. Visualisatie van de transcriptoomdata met behulp van het GenMapp-programma liet zien dat verschillende elementen van de TLR- sigtaaltransductieroute door de infectie geïnduceerd waren. Onder de geïnduceerde genen waren ook de twee isovormen van de Tlr5-receptor van de zebravis. In zoogdieren is aangetoond dat TLR5 het bacteriële eiwit flagelline kan detecteren, wat vervolgens tot het activeren van verschillende immuunrespons-genen leidt. Wij hebben aangetoond dat, ook bij zebravisembryo's, stimulatie met flagelline resulteert in de inductie van een repertoire aan genen, die eveneens door infectie met *S. typhimurium* geïnduceerd waren. Voorbeelden zijn het cytokine *il1b*, de chemokines *il8* en *cxcl-C1c*, en het matrix-metalloproteinase *mmp9*, alsmede *irak3*, een mogelijke negatieve regulator van de TLR-sigtaaltransductieroute. Om de functie van Tlr5 in het signaalproces bij de immuunreactie op flagelline te kunnen onderzoeken, hebben wij vervolgens Tlr5 in zebravisembryo's uitgeschakeld en daarna de reactie op flagelline in deze embryo's geanalyseerd. Uit deze analyse bleek duidelijk dat de inductie van *il1b*, *il8*, *cxcl-C1c*, *mmp9* en *irak3* afhankelijk was van Tlr5. Daarnaast wilden wij weten welke van deze genen ook van Myd88 afhankelijk waren. Om deze reden hebben wij Myd88 in de zebravisembryo's uitgeschakeld en het effect van een Salmonella-infectie onderzocht. Van de geanalyseerde genen bleken *mmp9*, *il1b* en *irak3* afhankelijk van Myd88 te zijn. Daarentegen konden wij geen verschil in reactie van *ifn1* en *il8* vinden, wat aantoont dat deze genen op een Myd88-onafhankelijke manier geactiveerd worden. Concluderend hebben onze resultaten voor het eerst aangetoond dat de ligandspecificiteit van een lid van de Toll-receptorfamilie geconserveerd is tussen de zebravis en de mens. Bovendien heeft onze studie het bestaan van Myd88-afhankelijke en niet-afhankelijke signaaltransductieroutes in het zebravisembryo gedemonstreerd.

De in **Hoofdstuk 3** beschreven transcriptoomanalyse heeft de bacterieel-geïnduceerde immuunreactie van het zebravisembryo gedetailleerd in kaart gebracht en biedt daarmee een sterke basis voor toekomstig immuun-gerelateerd onderzoek in het zebravisembryomodel. Voor het merendeel van de gevonden genen is de functie zowel in de zebravis als in de mens nog steeds onduidelijk. Het zebravisembryomodel is bij uitstek geschikt voor functioneel onderzoek van deze genen, omdat gebruik kan worden gemaakt van de snelle en eenvoudige manier van knock-down van

genen met behulp van morpholino's. Gezien de grote mate van overeenkomst die wij gevonden hebben tussen de immuunrespons van zebravisembryo's en die van humane cellen, kan met deze knock-down-analyses ook de annotatie van het humane genoom worden verbeterd.

In **Hoofdstuk 4** wordt de functie van Traf6 tijdens de immuunreactie op een bacteriële infectie van zebravisembryo's uitgelicht. TRAF6 vormt een belangrijk onderdeel van ondermeer de TLR- en de TNF-receptor-signaalroutes in vertebraten, waardoor TRAF6 zowel een rol speelt in immuun- als ook in ontwikkelingsprocessen. Dit bemoeilijkt het onderzoek naar de immuunfunctie van TRAF6 in het levende organisme aanzienlijk. In muizen leidt het uitschakelen van *Traf6* bijvoorbeeld tot ernstige ontwikkelingsdefecten en vroegtijdige dood van pasgeboren muizen. In het hier beschreven onderzoek hebben wij handig gebruik gemaakt van de mogelijkheid om Traf6 in de zebravisembryo's met behulp van morpholino's gedeeltelijk uit te schakelen, waardoor het effect op de ontwikkeling van de embryo's nog maar een marginale rol speelde. Vervolgens hebben wij, evenals in het voorafgaande hoofdstuk, naar de transcriptionele effecten van een systemische *S. typhimurium*-infectie in deze embryo's gekeken. Hiervoor hebben wij deze keer naast microarray-technologie tevens gebruik gemaakt van de recent ontwikkelde technologie voor RNA-sequencing (RNAseq).

Met de combinatie van microarray- en RNAseq-analyse waren wij in staat om 146 genen te identificeren die afhankelijk waren van Traf6 in de context van de *S. typhimurium*-infectie. Van een deel van deze genen is bekend dat zij een rol spelen tijdens de immuunrespons van het organisme. Voorbeelden zijn *il1b*, *mmp9*, *mmp13*, *hamp2*, *cxcl12* en *tnfb*. Verder bracht de analyse van de TLR-signaalroute aan het licht dat na Traf6 knock-down, de Salmonella-infectie niet meer tot een verhoogde Tlr5-expressie leidde. Daarnaast konden wij verschillende genen identificeren die niet eerder in verband waren gebracht met de functie van TRAF6. Voorbeelden zijn *gnrh2* (*gonadotropin releasing hormone 2*), *stc1* (*stanniocalcin 1*), *dgat1b* (*diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1b*) en *dram1* (*DNA-damage regulated autophagy modulator 1*). Trend-analyses van de expressiepatronen van de Traf6-afhankelijke genen lieten zien dat Traf6 een dynamische rol heeft tijdens de immuunrespons, zowel als positieve en negatieve regulator van specifieke gengroepen.

Tenslotte hebben wij in deze studie Traf6-afhankelijke genen gevonden, die op dit moment nog geen annotatie in de zebravis, muis of mens hebben. Ook was het niet mogelijk om een functie van deze genen te voorspellen op grond van geconserveerde eiwitdomeinen. Aangezien sommige van deze genen al twee uur na infectie een sterke inductie van het expressieniveau vertonen, zoals in hoofdstuk 3 staat beschreven, is toekomstig onderzoek naar deze genen van groot belang. Tevens bieden onze RNAseq-gegevens, de eerste transcriptoom-sequentiedata van een infectiestudie in vertebraten, een grote schat aan informatie die zeer waardevol is voor toekomstig onderzoek.

Zoals in Hoofdstuk 4 al staat beschreven, is Traf6 niet alleen belangrijk bij de sig-

naaltransductieprocessen tijdens infecties, maar ook bij de processen die gedurende de ontwikkeling van een organisme een rol spelen. In **Hoofdstuk 5** hebben wij om deze reden een poging ondernomen om de rol van Traf6 te ontrafelen in de context van de vroege embryogenese van de zebrafish. Op dezelfde wijze als beschreven in de voorafgaande hoofdstukken, hebben wij Traf6 in embryo's met behulp van morpholino's uitgeschakeld en deze embryo's vervolgens op het transcriptoom-niveau vergeleken met controle-embryo's. De analyse vond plaats op het ontwikkelingsstadium van 30% epiboly (4.6 uur na fertilisatie), het moment waarop de gastrulatie van het zebrafishembryo begint. Gebruikmakend van verschillende morpholino's gericht tegen *traf6* in combinatie met twee controle-morpholino's, waren wij in staat om een set van 868 genen te vinden, die tijdens vroege epiboly van Traf6 afhankelijk bleken te zijn.

Uit functionele classificatie van de geïdentificeerde set van genen bleek dat Traf6-knock-down tot een sterke inductie van genen leidde die een regulatieve functie bij apoptose hebben. Pro-apoptotische genen, zoals *bcl2-antagonist of cell death (bad)* en *bcl2-associated X protein (bax)* waren geïnduceerd, terwijl anti-apoptotische genen een verlaagd expressieniveau vertoonden. Deze resultaten zijn in overeenstemming met onderzoek uitgevoerd in celculturen van de muis, waaruit een anti-apoptotisch effect van TRAF6 bleek. Vergelijking van de transcriptoom-data uit hoofdstuk 4 met die van hoofdstuk 5 liet een beperkte overlap van 14 genen zien, die zowel in de vroege ontwikkeling als ook tijdens de immuunrespons van Traf6 afhankelijk waren. Deze slechts zeer beperkte overlap duidt erop dat Traf6 sterk verschillende functies tijdens de immuunrespons en de ontwikkeling heeft.

Bij de analyse van de transcriptoom-data in hoofdstuk 5 werd ook een set van genen gevonden die niet alleen door de Traf6-specifieke morpholino's, maar ook door de gebruikte controle-morpholino's gereguleerd werden. Verschillende van deze genen konden in samenhang gebracht worden met het immuunsysteem. Zo werd gevonden dat *tlr3*, *tlr4a*, *tlr4b* en *tlr9* een verlaagd expressieniveau vertoonden als respons op het morpholino-gebruik in het algemeen. Uit de *traf6* knock-down data konden wij concluderen dat de respons van *tlr3* op de morpholino's niet afhankelijk was van Traf6. Daarentegen bleek de respons van *tlr4a*, *tlr4b* en *tlr9* wel van Traf6 afhankelijk te zijn.

Concluderend konden wij laten zien dat na knock-down van Traf6 een groot aantal genen in expressieniveau veranderde, hetgeen op een cruciale rol van Traf6 tijdens de vroege zebrafish-embryogenese duidt. De minimale overlap tussen de infectie-geïnduceerde Traf6-afhankelijke genen en de Traf6-afhankelijke genen tijdens de ontwikkeling, demonstreert de sterke context-afhankelijke rol van Traf6. Daarnaast konden wij laten zien, dat verschillende TLR-genen in het algemeen op morpholino-behandelingen reageren, onafhankelijk van de morpholino-sequentie. Dit zou erop kunnen duiden dat zelfs tijdens de vroege embryonale ontwikkeling signaaltransductieroutes van het immuunsysteem functioneel zijn.

De hier beschreven studies hebben in grote mate bijgedragen aan de validatie

van het zebrawisembryomodel voor de analyse van het innate immuunsysteem van vertebraten. Naast de karakterisering van de embryonale transcriptoom-respons op een bacteriële infectie, hebben wij tevens de functie gedemonstreerd van signaaltransductiegenen, zoals *tlr5*, *myd88* en *traf6*, die een sleutelrol spelen in het innate immuunsysteem. In de afgelopen jaren zijn diverse zebrawis-infectiemodellen voor humane pathogenen gepubliceerd. Het gebruik hiervan heeft al tot verschillende nieuwe inzichten in gastheer-pathogeen-interacties geleid, met name op het gebied van tuberculose-onderzoek. De hier gepresenteerde transcriptoom-data van de immuunrespons in zebrawisembryo's leggen de basis voor functionele vervolgstudies, die nieuwe inzichten in signaaltransductieprocessen kunnen opleveren, welke vervolgens in zoogdiermodellen gevalideerd kunnen worden. De ontwikkeling van "high-throughput" screening-platforms, die gebaseerd zijn op zebrawis-infectiemodellen is een veelbelovende strategie voor het vinden van nieuwe anti-microbiële en anti-inflammatoire stoffen.