

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/35954> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Hosseini, Rohola

**Title:** The innate immune response against mycobacterial infection : analysis by a combination of light and electron microscopy

**Issue Date:** 2015-10-20

# APPENDIX

SAMENVATTING  
CURCULUM VITAE  
LIST OF PUBLICATIONS



# Samenvatting

De immuunreactie tegen een infectie met (myco)bacteriën bestaat uit een complexe intracellulaire signaaltransductie die leidt tot de activering van effector-moleculen met als doel de pathogeen te elimineren. Daarnaast worden intercellulaire signalen doorgegeven aan andere immuuncellen over de aanwezigheid van de infectie. Om deze activiteiten gericht te bestuderen kan de zebra vis als model worden gebruikt. In dit proefschrift is onderzoek beschreven dat erop gericht is om deze beide reacties van het immuunsysteem tegelijkertijd in beeld te brengen en te bestuderen.

In dit onderzoek hebben we een nieuw zebra vis-infectiemodel ontwikkeld, waarmee intracellulaire structuren met licht- en elektronenmicroscopie gevisualiseerd kunnen worden (**hoofdstuk 2**). In dit model worden pathogenen direct geïnjecteerd in de staartvin van een zebra vis larve, waardoor hier een lokale infectie ontstaat. In het geval van een infectie met *Mycobacterium marinum* (Mm) leidt dit tot de lokale vorming van enkele vroege granuloma-structuren, die kenmerkend zijn voor infecties van deze pathogeen. De staartvin is zeer geschikt voor het in beeld brengen van de infectie met hoge-resolutie lichtmicroscopie (LM), omdat het weefsel uit slechts enkele cellagen bestaat en de geïnfecteerde cellen zich op een relatief korte afstand van het objectief van de microscoop bevinden. De relatief lage hoeveelheid diffuus licht verbetert het contrast en de resolutie van de beelden gemaakt in dit weefsel. Voor transmissie-elektronenmicroscopie (TEM) heeft het lokale-infectiemodel het grote voordeel dat slechts een kleine hoeveelheid weefsel onderzocht hoeft te worden om het geïnfecteerde gebied in beeld te brengen.

Wanneer we larven in beeld brengen met behulp van LM, en ze daarna fixeren voor TEM, kunnen de beelden die worden verkregen door middel van deze twee verschillende microscopietechnieken worden gecorreleerd. In onze experimenten werd deze correlatie uitgevoerd op basis van de lokalisatie van de bacteriën, die zichtbaar zijn in lichtmicroscopie-opnames doordat ze fluorescent zijn en op basis van hun morfologie makkelijk kunnen worden herkend in de TEM beelden. Het visualiseren van intercellulaire interacties door middel van tijdsreeks-opnames (time-lapsing) werd uitgevoerd met behulp van confocale microscopie (**hoofdstuk 3**). De visualisatie van intracellulaire structuren werd op dezelfde monsters uitgevoerd met behulp van serial block face scanning elektronenmicroscopie (SBF-SEM) in hoofdstuk 3. We gebruikten SBF-SEM om de regio van onze interesse in de geïnfecteerde staartvin in 3D te visualiseren met hoge resolutie. Het vergelijken van de zelfde beeldregio's in de EM 3D foto's en beelden verkregen door confocale

microscopie werden ook gecorreleerd door de locatie van de bacteriën als referentiepunt te gebruiken. Na dit proces werden de fluorescente macrofagen en neutrofielen die waargenomen waren in de confocale beelden teruggezocht in de EM afbeeldingen. Met deze aanpak konden niet alleen de EM beelden gecorreleerd worden met de confocale beelden, maar kon ook het dynamisch gedrag van deze zelfde individuele leukocyten in de voorafgaande uren bepaald worden.

Autofagie is een proces dat letterlijk vertaald “zelfconsumering” betekent. In dit proces, dat in vrijwel alle cellen van hogere organismen voorkomt, worden beschadigde organellen of intact celmateriaal afgebroken, om brandstof vrij te maken in tijden van een te lage energie-aanvoer. Bij autofagie wordt een deel van het cytoplasma omsloten door een dubbele membraan, en deze structuur wordt een autofagosoom genoemd als het helemaal gesloten is. De autofagosomen die op deze manier ontstaan smelten vervolgens samen met lysosomen, die het lytische vermogen bezitten om de inhoud te verteren. In samengesmolten vorm worden deze blaasjes autolysosomen genoemd. Aanvankelijk beschouwde men dit proces alleen als een afbraakmechanisme van de cel, maar recent onderzoek ondersteunt de hypothese dat autofagie een belangrijke rol speelt in veel ziektebeelden zoals kanker, neurodegeneratieve aandoeningen en in de afweer tegen bacteriële infecties.

In dit proefschrift is autofagie tegen Mm onderzocht met behulp van LM en TEM door gebruik te maken van transgene zebrafish larven, waarin een GFP-Lc3 fusie-eiwit tot expressie is gebracht (**hoofdstuk 2**). Lc3 is een ubiquitine-achtig eiwit dat betrokken is bij de opbouw van autofagosomen en vaak wordt gebruikt als een marker voor autofagocytotische compartimenten. Twee soorten GFP-Lc3-positieve structuren werden geobserveerd na de infectie met Mm in de staartvin. Ten eerste, talrijke relatief kleine blaasjes (~1 micrometer) werden waargenomen die geen bacteriën bevatten. Deze kleine blaasjes bleken zeer dynamisch en kunnen samensmelten met andere compartimenten die wel bacteriën bevatten. Correlatie van licht- en elektronenmicroscopieplaatjes hebben laten zien dat deze kleine GFP-Lc3-positieve blaasjes in de nabijheid van bacteriën inderdaad de morfologische kenmerken hebben van een autofagosoom. Ten tweede waren er, in mindere mate, grotere GFP-Lc3 blaasjes aanwezig (~3 micrometer) die vaak bacteriën geheel omsloten hadden. De autofagosomale aard van deze blaasjes werd ondersteund door correlatieve licht- en elektronenmicroscopie plaatjes waaruit bleek dat de grotere GFP-Lc3 blaasje de bacteriën geheel hadden omsloten en daarnaast de morfologische kenmerken van een autolysosoom hadden. Het voordeel van het bestuderen van het infectieproces in een diermodel, in vergelijking met in vitro modellen, werd duidelijk toen deze verschillende autofagie reacties werden

vergeleken tussen immuuncellen en andere celtypen. De grotere bacterie-bevattende GFP-Lc3 positieve blaasjes werden vaker waargenomen in leukocyten (witte bloedcellen) dan in andere celtypen (hoofdzakelijk epitheelcellen in de staartvin).

Over het algemeen komen bacteriën in een cel terecht door fagocytose, een proces waarin de celmembraan zich om de pathogeen stulpt en waarin na het insluiten de pathogeen zich omgeven door de membraan van fagosoom in een ruimte binnen in de cel bevindt. Na het samensmelten van het fagosoom met lysosomen kan de inhoud hiervan afgebroken worden. Bepaalde bacteriën, waaronder Mm, kunnen deze samensmelting voorkomen en ontsnappen uit de het fagosoom naar het cytoplasma van de cel. De Mm die ontsnapt naar het cytoplasma kan vervolgens opgeruimd worden door autofagie. Door gebruik te maken van het staartvin-infectiemodel, waren we in staat om voor het eerst door middel van TEM de bacteriën-bevattende intracellulaire structuren te kwantificeren in een vroeg granuloom (**hoofdstuk 2**). Er werd bevestigd dat in dit stadium de bacteriën verbleven in verschillende celtypen en dat ze daarnaast aangetroffen kunnen worden in de extracellulaire matrix. We hebben het aantal intracellulaire bacteriën gekwantificeerd die zich individueel in de fagosomen, het cytoplasma, autofagocytische blaasjes of lysosomen bevonden, of zich als een groep bacteriën in aggregaten of zure aggregaten bevonden. Slechts een zeer kleine fractie (~0,4%) bacteriën werd waargenomen in een autofagosoom met een dubbele membraan, hetgeen waarschijnlijk te wijten is aan de zeer korte levensduur van deze structuren. De fractie bacteriën in autolysosomen was aanzienlijk groter (~4,5%). Een andere populatie van bacteriën bevond zich in fagosomen en deze fractie van de bacteriën (~11%) is óf zeer recent opgenomen uit de extracellulaire ruimte óf de bacteriën zijn erin geslaagd de lysosomale fusie te voorkomen. Voor Mm is in celculturen aangetoond dat de bacteriën in staat zijn uit fagosomen te ontsnappen, wat waarschijnlijk de ~13% vrije bacteriën in het cytoplasma verklaart. Deze fractie van bacteriën is een voor de hand liggend doelwit voor autofagie.

Macrofagen en neutrofielen dragen sterk bij aan de afweer tegen intracellulaire pathogenen, waaronder Mm. Deze fagocytotische cellen zijn de eerste strijders tegen binnendringende mycobacteriën en hun specifieke dynamische interacties met de pathogeen zijn grotendeels onbekend. We hebben het staartvin-infectiemodel gebruikt om de complexe interacties van macrofagen en neutrofielen onderling en met Mm te bestuderen tijdens een infectie met behulp van confocale microscopie en correlatieve licht- en elektronenmicroscopie (**hoofdstuk 3**). We zien dat in het begin van het infectieproces zowel macrofagen

als neutrofielen worden aangetrokken naar de locatie van de infectie. Anders dan eerder gerapporteerd in systemische-infectiemodellen, vonden we dat neutrofielen efficiënt zijn in het fagocyteren van Mm en dat ze met name in de initiële fase van de infectie verantwoordelijk zijn voor de verspreiding van Mm in de gastheer. Naast het fagocyteren van Mm door neutrofielen, hebben we ook associaties van neutrofielen met niet-gefagocyteerde bacteriën waargenomen. Dit soort interacties van neutrofielen met de pathogeen (of geïnfekteerde macrofagen) traden op gedurende enkele minuten zonder opname van bacteriën. We hebben neutrofielen waargenomen die dood gaan door netosis, een verdedigingsmechanisme waarbij DNA en antimicrobiële stoffen op de pathogeen vrijkomen, in gevallen waarin de bacteriële aggregaten waarschijnlijk te groot waren voor fagocytose. De macrofagen lijken een belangrijke rol te spelen in continu plaatsvindende efferocytosis, een proces dat wordt gedefinieerd als fagocytose van dode cellen met bacteriële inhoud. Hierdoor resulteert de infectie in de ophoping van bacteriën in macrofagen als grote aggregaten, waardoor de macrofagen uiteindelijk open barsten. Bij een dergelijke uitbarsting worden andere macrofagen en neutrofielen aangetrokken die de bacteriële inhoud opnemen. Deze opeenvolging van gebeurtenissen resulteert in de verspreiding van Mm door de gastheer en een toename in de bacteriële groei in de staartvin. Een oplossing van de gastheer om van de infectie af te komen is om de macrofagen (en neutrofielen) met veel bacteriën te extruderen uit de staartvin, en dit proces wordt gefaciliteerd door epitheelcellen.

Door Myd88 aangestuurde signaling speelt een belangrijke rol tijdens Mm infectie. In **hoofdstuk 4** zijn de vroege granuloomontwikkeling en de ultrastructuur van deze structuren in het staartvin-infectiemodel onderzocht in MyD88-deficiënte larven met behulp van zowel licht- als elektronenmicroscopie. De mutanten vertoonden een snellere toename van de bacteriële infectie, wat in overeenstemming is met eerdere studies die gedaan zijn met andere Mm infectiemodellen in larven met een Myd88 deficiëntie. Daarnaast observeerden wij een duidelijk verschillend fenotype van de infectie in de staartvin van de mutant in vergelijking tot de wild type larven. De Myd88-deficiënte larven vertoonden een compactere groei van Mm in grote extracellulaire aggregaten op de plaats van de infectie in vergelijking met de wild-types. Verder werd er een lager aantal leukocyten waargenomen op de plaats van infectie in vergelijking met de wild type. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een verminderde rekrutering van leukocyten naar de pathogeen in MyD88-/- larven door defecte signaling, en niet aan verhoogde celdood, aangezien er minder TUNEL-positieve cellen werden gevonden in de mutant.

In dit proefschrift wordt het zebrawis staartvin-infectiemodel gepresenteerd, dat het onderzoek van een complexe immuunrespons tegen (myco)bacteriële infectie met behulp van een combinatie van licht- en elektronenmicroscopie mogelijk maakt. De inductie van autofagie bij een mycobacteriële infectie als een belangrijke aangeboren immuunrespons werd gevisualiseerd met deze technologie. Het bestuderen van de rol van de functie en dynamiek van leukocyten in de loop van de infectie brengt ons nieuwe inzichten in de complexe interacties tussen een gastheer en een pathogeen. Binnen de vooruitgang in medisch translationeel onderzoek met behulp van zebrawis ziektemodellen kan het gebruik van het staartvin-infectiemodel bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën tegen pathogene infecties zoals tuberculose.v



