

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44243> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Torraca, V.

Title: Exploitation of host chemokine signalling by pathogenic mycobacteria

Issue Date: 2016-11-17

Dutch summary / Samenvatting

Het belangrijkste doel van het werk beschreven in dit proefschrift was om de functie van chemokinen bij de interactie tussen het aangeboren immuunsysteem en mycobacteriële pathogenen te onderzoeken. Chemokinen (chemotactische cytokinen) zijn kleine signaaleiwitten die een centrale rol spelen bij immuniteit en ontstekingsreacties. De verschillende chemokinen die door een gastheer geproduceerd worden als reactie op een mycobacteriële infectie kunnen beschermende functies hebben, maar kunnen ook bijdragen aan de pathologie van de ziekte, zoals geïllustreerd wordt door het werk in dit proefschrift.

Tuberculose (TBC) vormt een wereldwijd gezondheidsprobleem. Deze ziekte wordt veroorzaakt door infectie met *Mycobacterium tuberculosis*, een bacterie die zich al sinds prehistorische tijden aan de mens heeft aangepast en door de eeuwen heen veel dodelijke slachtoffers heeft gemaakt. In de 21^e eeuw, meer dan 130 jaar na de ontdekking van deze besmettelijke ziekteverwekker, zijn we nog ver verwijderd van het uitbannen van TBC. Er wordt geschat dat ongeveer een derde van de wereldbevolking chronisch is geïnfecteerd met *M. tuberculosis* en daarom de kans heeft om TBC te ontwikkelen. TBC kan genezen worden door langdurige behandeling met een cocktail van antibiotica die verschillende essentiële processen van de bacteriegroei verstoren, zoals celwandsynthese of DNA- en eiwitsynthese. Een belangrijke complicatie bij de hedendaagse TBC-bestrijding is de opkomst van resistente stammen die niet meer reageren op de conventionele antibioticatherapie. Het probleem van multiresistentie benadrukt de noodzaak tot het ontwikkelen van nieuwe strategieën om de ziekte tegen te gaan. *M. tuberculosis* heeft het vermogen om immuuncellen van de gastheer te parasiteren. Om dat te bewerkstelligen manipuleert de bacterie verschillende signaleringssystemen van de gastheercellen. Het is daarom een aantrekkelijke hypothese dat TBC mogelijk behandeld zou kunnen worden met geneesmiddelen die op de gastheer werken in plaats van op de ziekteverwekker zelf. Met de ontwikkeling van geneesmiddelen voor zulke gastheerdoelwitten zouden niet alleen de behandelingsmogelijkheden voor TBC uitgebreid kunnen worden, maar zou ook de kans dat de bacteriën resistenties ontwikkelen verkleind kunnen worden.

Omdat het chemokinenetwerk cruciaal is voor de communicatie tussen cellen van het immuunsysteem, kan dit netwerk betrokken zijn bij verschillende aspecten van TBC. Enerzijds kunnen chemokinen de afweer van de gastheer stimuleren, maar anderzijds kunnen de processen die door chemokinen worden aangestuurd ook omzeild of zelfs benut worden door mycobacteriën. Chemokinen werken via de klasse van zogenoemde G-eiwitgekoppelde receptoren. Deze receptoren zijn in de praktijk zeer succesvolle doelwitten gebleken voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen verschillende ziekten. Daarom zijn de chemokinerceptoren mogelijk ook geschikte therapeutische doelwitten voor nieuwe gastheer-gerichte therapieën tegen TBC.

Zoals wordt uitgewerkt in **Hoofdstuk 1** en **Hoofdstuk 2** is de zebravis (*Danio rerio*) een uitstekend diermodel voor het bestuderen van de biologie van aangeboren immuuncellen (macrofagen en neutrofielen) en de moleculaire en cellulaire basis van infectieziekten. Dit geldt vooral voor de embryonale en larvale stadia, die behalve optisch transparant, ook chemisch en genetisch traceerbaar zijn. De zebravis is een natuurlijke gastheer voor

Mycobacterium marinum, een bacterie die nauw verwant is aan *M. tuberculosis*. Het zebra-*M. marinum*-model recapituleert de belangrijkste moleculaire, cellulaire en histopathologische aspecten van humane TBC. De treffende gelijkenis tussen vissen-TBC en de humane ziekte is niet alleen interessant vanuit een evolutionair oogpunt, maar ook wetenschappelijk aantrekkelijk voor onderzoek naar TBC. Dit is niet alleen vanwege de strenge restricties om te werken met de humane pathogeen, maar ook omdat *M. tuberculosis* in muizen de humane ziekte niet volledig kan reproduceren. De laatste jaren is bovendien gebleken dat verscheidene humane chemotactische signalen moleculair en functioneel geconserveerd zijn in de zebra-*M. marinum*, wat suggereert dat deze signalen mogelijk ook een overeenkomstige rol bij mycobacteriële infecties zouden kunnen spelen. Daarom biedt het embryonale/larvale zebra-*M. marinum*-platform een inzichtelijk systeem om mycobacteriële infecties te modelleren. De toepassing van dit model heeft geleid tot de ontdekking van nieuwe virulentiemechanismen waarbij chemokinesignalering een rol speelt.

In **Hoofdstuk 3** hebben wij gevonden dat de zebra-*M. marinum* een geconserveerde Cxcr3.2/Cxcl11aa-11af-signalering heeft met een belangrijke functie in macrofagen, net zoals de homologe CXCR3/CXCL9-10-11-signalering in zoogdieren. Homozygote *cxcr3.2*-mutanten lieten een deficiëntie zien in het rekruteren van macrofagen naar recombinante Cxcl11aa-11af-eiwitten en naar infecties met bacteriën (waaronder *M. marinum*) die de productie van Cxcr3.2-liganden opwekken. Opvallend was dat de *cxcr3.2*-mutatie tot resistentie tegen mycobacteriële infectie leidt, doordat deze mutatie de verspreiding van de bacteriën vermindert en de ontwikkeling van de zogenoemde granulomen vertraagt. Granulomen zijn besmettelijke ontstekingshaarden die bestaan uit geïnfecteerde immuuncellen (vooral macrofagen) die worden ingesloten door andere ongeïnfecteerde immuuncellen. Het ontstaan van tuberculeuze granulomen is een belangrijk kenmerk van de mycobacteriële infectie en deze structuren vormen de natuurlijke niche van mycobacteriën. Binnen het granuloom verblijven de mycobacteriën voornamelijk intracellulair in de macrofagen en extracellulair in het necrotisch centrum dat ontstaat door de dood van geïnfecteerde macrofagen. De Cxcr3.2-receptor bevordert de migratie van macrofagen en is daarom een belangrijke factor in de granuloomvorming. De migratie van macrofagen naar mycobacteriën in de zebra-*M. marinum* kon behalve door mutatie van *cxcr3.2* ook geremd worden met behulp van een CXCR3-antagonist (NBI74330). Deze resultaten suggereren dat behandeling met CXCR3-remmers mogelijk zou kunnen worden toegepast om TBC-infectie te beperken.

In **Hoofdstuk 4** hebben wij verder onderzoek gedaan naar de signaleringsprocessen die afhankelijk zijn van Cxcr3.2. Hiertoe hebben we macrofagen gesorteerd uit *cxcr3.2*-mutanten en hun transcriptoom geprofileerd met RNA-sequentieanalyse. Verrassend genoeg ontdekten we dat de *cxcr3.2*-mutatie tot kenmerken van lysosomale stress leidt en zorgt voor een gecoördineerde inductie van verschillende lysosomale genen, waaronder genen die coderen voor hydrolytische enzymen en onderdelen van de lysosomale protonpompen. Om deze resultaten te bevestigen hebben we aangetoond dat deze kenmerken samengaan met een verhoogde verzuring van de bacterie-bevattende compartimenten en met een versterkte microbicide activiteit. Om meer inzicht te krijgen in hoe lysosomale stress in macrofagen wordt opgewekt door een tekort aan chemotactische signalen, hebben we de migratie van macrofagen gevolgd na toepassing van een lysosoomkleuring. Opvallend was dat de lysosomen zich tijdens het migratieproces verplaatsen naar de voorkant van de bewegende cel en dat *cxcr3.2*-mutatie hier een remmend effect op heeft. De ophoping van lysosomen aan de voorkant van migrerende

cellen is mogelijk een teken van de exocytose van lysosomen, een proces dat kan worden geïnduceerd door chemokinen en belangrijk is voor membraanvoorziening aan de uitgestrekte lamellipodia. Een interessante waarneming was dat macrofagen zelf de expressie van *cxcl11aa* induceren tijdens de mycobacteriële infectie. De Myd88-siginaalroute, die betrokken is bij de herkenning van pathogenen door het immuunsysteem, bleek essentieel te zijn voor de expressie van *cxcl11aa*. Daarom veronderstellen we dat het circuit van immuunherkenning, chemokinesignalering en lysosoomfunctie mogelijk de pathoog op twee manieren kan bevoordelen. Ten eerste kan de inductie van Cxcr3.2-afhankelijke signalering het granuloom voeden met nieuwe macrofagen die vervolgens besmet kunnen worden en ten tweede kan deze signalering voor een meer toegankelijke intracellulaire niche zorgen, omdat de lysosomale functies onderdrukt worden.

Hoofdstuk 5 rapporteert over een voorlopige karakterisering van de functie van Cxcr3.3, een andere homolog van de humane CXCR3-receptor in de zebrafis. In dit hoofdstuk wordt allereerst beschreven hoe we de CRISPR/Cas9-methode hebben toegepast om een *cxcr3.3*-mutant te verkrijgen, waarbij we een aantal verbeteringen in het protocol hebben ingevoerd om de mutagenese te optimaliseren. De analyse van *cxcr3.3*-mutanten liet vervolgens zien dat deze gevoeliger zijn voor mycobacteriële infecties, wat tegenovergesteld is aan het fenotype van de *cxcr3.2*-mutant. Een dubbelmutant van *cxcr3.2* en *cxcr3.3* zal nodig zijn om deze tegenstelling verder te onderzoeken, maar als alternatief hebben we gekeken naar het effect van behandeling met de NBI74330-remmer, die even goed tegen Cxcr3.2 als tegen Cxcr3.3 zou moeten werken vanwege de overeenkomstige structuur van de receptoren. Deze receptorantagonist had een positief effect op de resistentie van zebrafisembryo's tegen mycobacteriële infectie, overeenkomstig met het fenotype van de enkele *cxcr3.2*-mutant. Dit resultaat suggereert dat de functie van de Cxcr3.3-receptor afhankelijk is van die van de Cxcr3.2-receptor. Ter ondersteuning van deze hypothese ontdekten wij dat de sequentie van Cxcr3.3 een aantal belangrijke verschillen vertoont in vergelijking met andere G-eiwit-gekoppelde chemokinereceptoren. Het meest opmerkelijke verschil is de vervanging van een Arginine-residu in het Asparaginezuur-Arginine-Tyrosine-motief (DRY-motief), het meest geconserveerde motief van de functionele G-eiwit-gekoppelde receptoren. Het Arginine-residu is 100% geconserveerd in de functionele humane CXCR3-receptoren en is noodzakelijk voor de interactie met heterotrimere G-eiwitten en voor de activering van de onderliggende signaalroute. Het DRY-motief is daarentegen vaak afwijkend (of geheel afwezig) in atypische chemokinereceptoren. Deze atypische receptoren concureren met de functionele receptoren voor de binding van chemokinen en kunnen op die manier chemokineconcentratiegradiënten reguleren. Het voorkomen van atypische CXCR3-isovormen is een terugkerend fenomeen in beenvissen, terwijl het verloren lijkt te zijn gegaan tijdens de evolutie van tetrapoden en kwastvinnige vissen, die nauw verwant zijn aan tetrapoden. Atypische Cxcr3.3-receptoren zijn daarom niet uniek voor de zebrafis en hebben mogelijk een belangrijke geconserveerde functie in het immuunsysteem van vissen. Verder onderzoek hiernaar kan helpen om de evolutionaire geschiedenis van chemokinereceptoren te reconstrueren.

In **Hoofdstuk 6** hebben wij de functie van de chemokinereceptor Cxcr4b geanalyseerd en geconstateerd dat mutatie van deze receptor de groei van granulomen in de weefsels van de romp van zebrafisembryo's beperkt. Een kenmerk van de weefsels in de romp is dat hier weinig bloedvaten doorheen lopen. Om in grootte te kunnen toenemen, moeten de granulomen in deze weefsels daarom nieuwe bloedvaten aantrekken (angiogenese). De

beperkte groei van granulomen in *cxcr4b*-mutanten bleek een correlatie te vertonen met verminderde angiogenese. In een poging om te ontrafelen hoe Cxcr4b de bloedvatvoorziening van granulomen bevordert, vonden we dat *cxcr4b*-mutanten een verminderde inductie vertonen van genen betrokken bij ontstekingsreacties, in het bijzonder het gen dat codeert voor het ontstekingsbevorderende cytokine Il1b. Dit cytokine is een pleiotroop molecuul dat ook bekend staat om zijn proliferatieve en pro-angiogene effecten op de cellen van de wand van bloedvaten (endotheelcellen). Het *il1b*-gen komt grotendeels tot expressie in de geïnfecteerde cellen in de granulomen en vormt mogelijk een belangrijke verbinding tussen Cxcr4b en de activering van de ontstekingsreactie in deze structuren.

In **Hoofdstuk 7** karakteriseren wij de functie van Cxcl18b, een chemokine dat specifiek is voor de zebraavis. Door middel van injectie van recombinant Cxcl18b-eiwit laten we zien dat dit chemokine een krachtige chemoattractant van neutrofielen is, terwijl het geen invloed heeft op het aantrekken van macrofagen. We hebben bovendien aangetoond dat Cxcl18b zijn functie in ieder geval gedeeltelijk uitoefent via de chemokinereceptor Cxcr2, die eerder werd beschreven als de receptor voor twee CXCL8/IL8-achtige chemokinen. De expressie van *cxcl18b* is sterk induceerbaar door mycobacteriële infecties en andere ontstekingscondities. Daarom kan *cxcl18b* een bruikbare marker zijn om de ontwikkeling van ontstekingsreacties te volgen. We hebben een *cxcl18b*-reporter geconstrueerd en zagen dat deze reporter de endogene inductie van *cxcl18b* reproduceert tijdens mycobacteriële infectie. Interessant genoeg bleek dat de geïnfecteerde cellen niet de belangrijkste bron van expressie van de *cxcl18b*-reporter zijn, maar dat ongeïnfecteerde cellen in de granulomen het transgen sterk tot expressie brengen. Deze observatie suggereert dat de reporter kan worden gebruikt om reacties te onderscheiden die worden geactiveerd in specifieke subpopulaties van cellen waaruit granulomen bestaan en die belangrijk zouden kunnen zijn voor de rekrutering van neutrofielen. Deze transgene lijn lijkt daarom nuttig voor toekomstig onderzoek naar de functie van neutrofielen in mycobacteriële ziekten, waarover nu nog weinig bekend is.

Dit proefschrift wordt afgesloten met een algemene discussie in **Hoofdstuk 8**, waarin onze resultaten worden besproken in relatie tot recente inzichten in aangeboren immuniteit en mycobacteriële ziekten. We bediscussiëren de dubbele functie van macrofagen, die aan de ene kant noodzakelijk zijn om een mycobacteriële infectie in te perken, maar aan de andere kant juist kunnen bijdragen aan de verspreiding van de bacteriën in de weefsels van de gastheer. Tevens gaan we erop in op hoe de lysosomale stressreactie bij kan dragen aan resistentie tegen infecties, terwijl lysosomale stapelingsziekten juist geassocieerd zijn met een grotere vatbaarheid voor infecties. Hierbij bespreken we hoe deze kennis benut zou kunnen worden voor nieuwe therapeutische strategieën. Daarnaast hebben we getracht om een verklaring te vinden voor onze resultaten met betrekking tot de atypische Cxcr3.3-receptor, waarvan mutatie tot verhoogde vatbaarheid voor infectie leidt. Hiertoe hebben we onze bevindingen vergeleken met een studie in muizen die een mutatie hebben in een andere atypische chemokinereceptor en die een vergelijkbaar fenotype vertonen na infectie met *M. tuberculosis*. Voorts plaatsen we onze resultaten over het effect van Cxcr4b op angiogenese en de ontstekingsreactie in granulomen in de context van literatuur waarmee de functie van CXCR4 bij inductie van pathologische angiogenese en modulatie van ontstekingsreacties wordt ondersteund. Vervolgens wordt besproken hoe het zebravismodel kan helpen om meer inzicht te verkrijgen in de functie van chemokinen bij het reguleren van de betrokkenheid van neutrofielen in mycobacteriële ziekten. Het hoofdstuk wordt

besloten met enkele algemene reflecties over de pleiotropische functies en complexiteit achter het chemokine-signaleringsnetwerk en over hoe het zebra-vismodel kan bijdragen aan ons begrip van deze en andere multidimensionale biologische processen.

Concluderend, het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven heeft bijgedragen aan het verduidelijken van de betrokkenheid van het chemokinenetwerk bij verschillende aspecten van mycobacteriële infectie. Onze resultaten benadrukken hoe dit intrigerende netwerk kan leiden tot verschillende uitkomsten die gunstig kunnen zijn voor de gastheer of juist voor de pathogeen. Daarnaast hebben we laten zien dat signalering door chemokinen niet alleen de rekrutering van immuuncellen reguleert, maar ook het expressieprofiel van deze cellen en hun immunocompetentie tegen de binnendringende bacteriën. Bovendien heeft het zebra-vismodel longitudinaal *in vivo* onderzoek mogelijk gemaakt om de cellulaire dynamica en moleculaire routes te volgen die de chemokinensignalering activeren (of hierdoor worden geactiveerd). Ten slotte heeft het gebruik van dit gastheermodel het mogelijk gemaakt om deze nieuwe bevindingen over chemokinensignalering rechtstreeks te relateren aan pathologische consequenties op het niveau van de gastheer tijdens de mycobacteriële ziekte. Deze aanpak heeft ons geholpen om op een dieper niveau inzicht te krijgen in de complexiteit achter de mycobacteriële ziekte en om te begrijpen hoe verschillende celtypen (zoals neutrofielen, macrofagen, en endotheelcellen) en verschillende gastheerfactoren (zoals chemokinen, ontstekingsmoleculen en angiogenesefactoren) een interactie met elkaar aan gaan en als geheel in een systeem samenwerken, wat uiteindelijk leidt tot de ontwikkeling van de ziekte.