



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Glucocorticoid modulation of the immune response: Studies in zebrafish

Xie, Y

Citation

Xie, Y. (2020, November 26). *Glucocorticoid modulation of the immune response: Studies in zebrafish*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138400>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/138400>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138400> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Xie, Y.

Title: Glucocorticoid modulation of the immune response: Studies in zebrafish

Issue Date: 2020-11-26

Samenvatting

De zebravis als diermodel om de effecten van glucocorticoïden op het immuunsysteem te bestuderen

Glucocorticoïden reguleren, door activering van de glucocorticoïd-receptor (GR), een groot aantal verschillende systemen in ons lichaam, zoals het zenuwstelsel, ons hart- en bloedvatstelsel, en onze stofwisselings-, voortplantings-, en immuunsystemen. Vanwege de welbekende remmende werking op het immuunsysteem worden glucocorticoïden veelvuldig voorgeschreven als ontstekingsremmende geneesmiddelen. Echter, dit gebruik van glucocorticoïden als anti-inflammatoire geneesmiddelen wordt ernstig beperkt doordat ze zware bijwerkingen hebben en er vaak resistentie optreedt. Daarom is het nog steeds noodzakelijk dat er onderzoek wordt gedaan naar de moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de effecten van glucocorticoïden. Deze mechanismen blijken bijzonder ingewikkeld te zijn, omdat de effecten van glucocorticoïden afhankelijk zijn van het celtype en de context waarin de cel zich bevindt, en omdat de effecten van glucocorticoïden op de transcriptie van pro-inflammatoire genen niet uitsluitend inhiberend zijn.

De zebravis wordt steeds vaker gebruikt als *in vivo* modelsysteem om het immuunsysteem te bestuderen, vooral de inflammatoire respons, ten behoeve van onderzoek dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe aanknopingspunten voor geneesmiddelen (drug targets) en voor het grootschalig testen van mogelijke nieuwe geneesmiddelen. Het immuunsysteem van de zebravis lijkt zeer op het onze en dit diermodel heeft verschillende voordelen, zoals het gemak waarmee de embryo's genetisch kunnen worden gemanipuleerd en onder de microscoop worden bekeken, en het relatief goedkope onderhoud. In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt een overzicht gegeven van hoe de zebravis wordt gebruikt als diermodel voor ontstekingsziektes. Verschillende modellen worden beschreven en ook wordt geïllustreerd hoe deze modellen worden gebruikt voor onderzoek naar de mechanismen die de inflammatoire respons veroorzaken en voor het testen van mogelijke nieuwe anti-inflammatoire geneesmiddelen, in het bijzonder glucocorticoïden. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de structuur en functie van de zebravis-Gr heel erg lijkt op die van de mens en dat ook de regulatie van de secretie van glucocorticoïden zeer goed vergelijkbaar is met die van de mens. Dit maakt de zebravis een zeer geschikt diermodel om de complexe effecten van glucocorticoïden op het immuunsysteem te bestuderen. In dit proefschrift hebben we de zebravis gebruikt om de moleculaire en cellulaire mechanismen van de werking van glucocorticoïden op het immuunsysteem te bestuderen

en om een model te ontwikkelen om *in vivo* zowel de anti-inflammatoire werking als de bijwerkingen te bestuderen van nieuwe glucocorticoïd-formuleringen. Hiervoor hebben we onderzocht welke effecten glucocorticoïden hebben op de migratie en differentiatie van leukocyten tijdens een inflammatoire respons (**Hoofdstuk 3**), hoe glucocorticoïden de immuunrespons tegen een mycobacteriële infectie beïnvloeden (**Hoofdstuk 4**), en hoe glucocorticoïden specifiek naar ontstoken weefsel kunnen worden vervoerd door middel van liposomen (**Hoofdstuk 5**).

Glucocorticoïden inhiberen de differentiatie van macrofagen naar een pro-inflammatoir fenotype door transcriptie te reguleren

In **Hoofdstuk 3** is onderzoek beschreven waarin we de staartvin van zebravislarven hebben geamputeerd om een ontstekingsreactie op te wekken. In dit ‘staartvinamputatiemodel’ migreren twee typen leukocyten, macrofagen en neutrofielen, naar het weefsel dat is beschadigd door de amputatie. Behandeling met het glucocorticoïd beclomethasone remt de migratie van de neutrofielen naar deze wond. Echter, zoals eerder waargenomen was in studies van onze groep, de migratie van macrofagen wordt niet verminderd door dit glucocorticoïd. Verdere experimenten toonden aan dat het verschil in het effect van glucocorticoïden op de migratie van neutrofielen en macrofagen waarschijnlijk voortkomt uit het feit dat glucocorticoïden wel de expressie verlagen van genen die coderen voor chemokines die betrokken zijn bij het laten migreren van neutrofielen naar de wond (zoals *IL8* en *Cxcl18b*), maar niet de expressie beïnvloeden van chemokines die een rol spelen bij de migratie van macrofagen (zoals *Ccl2* en *Cxcl11aa*).

Om te zien of macrofagen werkelijk resistentie tegen glucocorticoïden vertonen in ons model, hebben we een ‘RNAsequencing’ analyse uitgevoerd op macrofagen die we uit de zebravislarven hadden geïsoleerd. De resultaten van dit experiment lieten zien dat behandeling met glucocorticoïden vrijwel alle veranderingen in transcriptie als gevolg van de amputatie in deze cellen blokkeert, waaronder de verhoogde transcriptie van veel pro-inflammatoire genen. Door gebruik te maken van een fluorescente reporter-vislijn konden we aantonen dat het aantal macrofagen waarin het pro-inflammatoire *tnf* gen tot expressie kwam, was verminderd na behandeling met glucocorticoïden. Tenslotte zagen we dat glucocorticoïden ook het percentage verminderde van macrofagen die een ronde morfologie vertonen die kenmerkend is voor deze cellen tijdens een inflammatoire respons. Uit deze resultaten concluderen we dat in ons model glucocorticoïden weliswaar de migratie van macrofagen niet remmen, maar dat ze wel de differentiatie van deze cellen naar een pro-inflammatoir fenotype inhiberen, door vrijwel alle transcriptionele veranderingen in deze cellen tijdens een inflammatoire respons te blokkeren.

Glucocorticoïden verergeren een mycobacteriële infectie door de fagocytose-activiteit van macrofagen te verminderen

Om de functionele consequenties van de waargenomen effecten van glucocorticoïden op immuuncellen te bestuderen, hebben we in **Hoofdstuk 4** onderzoek verricht naar hoe glucocorticoïden een infectie beïnvloeden met *Mycobacterium marinum* (*Mm*), een bacteriesoort die verwant is aan *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), de bacterie die verantwoordelijk is voor tuberculose bij mensen. *Mm* veroorzaakt een tuberculose-achtige infectie in zebravis en zebravislarven worden daarom veel gebruikt om de interacties tussen gastheer en pathogeen bij tuberculose te bestuderen en om onderzoek te doen dat gericht is op het ontwikkelen van mogelijke nieuwe therapeutische strategieën. Een verhoogde kans op infecties is een belangrijke bijwerking van behandeling met glucocorticoïden, als gevolg van het onderdrukte immuunsysteem, en het is bekend dat glucocorticoïden de kans op het krijgen van tuberculose verhogen.

Wij vonden dat het glucocorticoïd beclomethasone het infectieniveau van *Mm* in zebravislarven verhoogde. Deze verhoogde infectiegraad ging samen met een verminderde fagocytose-activiteit van de macrofagen, als gevolg van een verminderde transcriptie van fagocytose-gerelateerde genen in deze cellen. Ook toen we een andere intracellulaire bacterie gebruikten voor de infectie, *Salmonella* Typhimurium, zagen we een verminderde fagocytose door macrofagen na behandeling met glucocorticoïden. Ten slotte resulteerde de verminderde fagocytose van *Mm* in minder celdood van de macrofagen en in een grotere extracellulaire bacteriepopulatie. De conclusie van dit werk is dat glucocorticoïden bacteriële infecties kunnen verergeren door de fagocytose van de bacteriën door macrofagen te inhiberen. Dit doen ze door te interfereren met de transcriptie van genen die coderen voor eiwitten die bij fagocytose zijn betrokken. Deze resultaten zouden een mechanistische verklaring kunnen vormen voor het feit dat behandeling met glucocorticoïden de vatbaarheid voor tuberculose verhoogt.

Liposomale formulering van glucocorticoïden versterkt hun anti-inflammatoire effect en vermindert de bijwerkingen

Hoofdstuk 5 beschrijft experimenten waarin we hebben bestudeerd hoe we glucocorticoïden specifiek in het ontstoken weefsel terecht kunnen laten komen. In onze studie hebben we het glucocorticoïd prednisolone phosphate (PLP) in liposomen verpakt en bekeken hoe het dan wordt getransporteerd in zebravislarven waarin met behulp van een laser een verwonding is aangebracht. Daarnaast hebben we zowel de anti-inflammatoire werking van PLP gemeten als de effecten op het herstel van weefsel na een amputatie en de activering van een glucocorticoïd-gevoelig reporter-gen (als indicator voor

mogelijke bijwerkingen). We hebben twee typen liposomen getest: een gePEGyleerd liposoom, dat relatief ongevoelig is voor opname door fagocyterende cellen, en een liposoom dat juist heel gevoelig is voor fagocytose door macrofagen.

Beide soorten liposomen vonden we in verhoogde concentratie aanwezig in het gebied waar de wond zich bevond, enkele uren nadat we die wond met de laser hadden aangebracht. Onze resultaten lieten verder zien dat beide soorten liposomen het effect van PLP op de migratie van neutrofielen naar de wond versterken, waarbij het soort liposoom dat gevoelig is voor fagocytose door macrofagen zelfs iets effectiever was dan de gePEGyleerde liposomen. PLP remt normaalgesproken het herstel van weefsel na amputatie van de staartvin, maar beide liposomale formuleringen verminderden dit effect van PLP. Tenslotte werd de activering van het glucocorticoïd-gevoelige reporter-gen door PLP alleen verminderd door de gePEGyleerde liposomale formulering. Deze resultaten laten zien dat de zebravis een zeer geschikt model is om een groot aantal verschillende liposomale formuleringen van glucocorticoïden te testen, omdat niet alleen de (dynamiek van de) verdeling in het lichaam kan worden vastgesteld, maar ook de therapeutische anti-inflammatoire effecten en de manier waarop processen als herstel van weefsel na een verwonding worden beïnvloed, die exemplarisch zijn voor de bijwerkingen van glucocorticoïden. Als ‘proof-of-principle’ hebben we laten zien dat zowel een gePEGyleerde liposomale formulering als een formulering die gevoelig is voor fagocytose door macrofagen, de therapeutische ratio van PLP verhoogt.

Conclusies

Een brede kennis omtrent de effecten van glucocorticoïden op het immuunsysteem is noodzakelijk om anti-inflammatoire behandelingen met glucocorticoïden te kunnen verbeteren. Ons werk laat een algemeen inhiberend effect zien van glucocorticoïden op het pro-inflammatoire fenotype van macrofagen en op de fagocytose-activiteit van deze cellen. Deze resultaten laten zien dat macrofagen een belangrijk doelwit zijn van anti-inflammatoire glucocorticoïden (**Hoofdstuk 3 en 4**). In overeenstemming met dit idee werd de therapeutische ratio van glucocorticoïden verhoogd, wanneer we ze specifiek lieten opnemen door macrofagen door ze in te pakken in bepaalde liposomen. Daarbij dient wel te worden vermeld dat inpakken in liposomen die niet gevoelig waren voor fagocytose een vergelijkbaar effect had (**Hoofdstuk 5**). Het werk dat beschreven is in dit proefschrift heeft ons begrip vergroot van hoe glucocorticoïden de immuunrespons beïnvloeden tijdens een inflammatoire respons, waarbij gebruik gemaakt werd van de zebravis als diermodel. Deze kennis en de ontwikkelde modellen kunnen een bijdrage leveren aan het preklinische onderzoek dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe anti-inflammatoire geneesmiddelen.