



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Key innate immune components controlling intracellular infection

Benard, E.L.

Citation

Benard, E. L. (2014, September 25). *Key innate immune components controlling intracellular infection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/28940>

Version: Corrected 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/1887/28940>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28940> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Benard, Erica L.

Title: Key innate immune components controlling intracellular infection

Issue Date: 2014-09-25

Samenvatting

Verdediging tegen bacteriële infecties door het aangeboren immuunsysteem

Het immuunsysteem speelt een belangrijke rol in de snelle bestrijding van ziekteverwekkers die het lichaam zijn binnengedrongen. Het immuunsysteem is onder te verdelen in twee componenten: het aangeboren immuunsysteem en het adaptieve immuunsysteem. Het aangeboren immuunsysteem is al vanaf de geboorte aanwezig terwijl het adaptieve immuunsysteem zich pas later begint te ontwikkelen. Het zebravisembryo is een uitstekend model om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen omdat de embryo's tijdens de eerste ontwikkelingsdagen al actieve gespecialiseerde aangeboren immuuncellen bevatten: macrofagen en neutrofielen, twee belangrijke typen van witte bloedcellen. Hierdoor kunnen specifiek de functies van het aangeboren immuunsysteem bestudeerd worden zonder dat deze beïnvloed worden door het adaptieve immuunsysteem. Bovendien ontwikkelen de embryo's zich buiten de ouderlijke vis en zijn ze doorzichtig waardoor er gemakkelijk kan worden waargenomen wat zich in het binnenste van het embryo afspeelt.

Het zebravisembryo wordt veel gebruikt als model voor onderzoek naar mycobacteriële infectie. Mycobacteriën veroorzaken levensbedreigende menselijke ziekten, waaronder tuberculose en lepra. In het zebravisonderzoeksmodel wordt de bacterie *Mycobacterium marinum* gebruikt, een natuurlijke ziekteverwekker van vissen en nauw verwant aan de menselijke variant ervan: *Mycobacterium tuberculosis*. De meest kenmerkende infectiestructuur van tuberculose is het zogenaamde granuloom, een opeenhoping van geïnfecteerde en niet geïnfecteerde cellen. Het zebravisonderzoeksmodel is erg belangrijk geweest om aan te tonen dat het aangeboren immuunsysteem zelf in staat is om granulomen te laten ontstaan. Voorheen dacht men dat dit alleen plaats kon vinden in aanwezigheid van het adaptieve immuunsysteem. Daarnaast veronderstelde men vroeger ook dat granuloomontwikkeling in gang werd gezet door het immuunsysteem om daarmee de infectie af te schermen van de rest van het lichaam. Zebravisonderzoek heeft inmiddels echter aangetoond dat deze veronderstelling maar ten dele klopt: het is gebleken dat het de bacterie is die het begin van de granuloomvorming aanstuurt en de vroege stadia van de granulomen helpen juist in het verspreiden van de infectie. Deze voorbeelden laten zien hoe belangrijk het is om verschillende modellen te gebruiken om onze kennis van infectieprocessen compleet te maken.

Dit proefschrift is gericht op verdedigingsmechanismen van het aangeboren immuunsysteem die verantwoordelijk zijn voor de controle van mycobacteriële groei na infectie in een zebravisembryo. Daarnaast is ook een andere intracellulaire bacterie, *Salmonella typhimurium*, gebruikt om de rol van immuunogenen in verschillende infectieprocessen te vergelijken. Om zebravisembryo's te infecteren met bacteriën

worden speciale injectietechnieken gebruikt die in hoofdstuk 2 en in een videoartikel (www.jove.com/video/3781) verder beschreven zijn. In dit hoofdstuk wordt tevens toegelicht hoe de geïnfecteerde embryo's met geavanceerde microscopen bekeken worden en welke resultaten men kan verkrijgen door toepassing van de verschillende injectietechnieken.

Om te kunnen vastleggen welke immuogenen een rol spelen in het controleren van mycobacteriële groei tijdens de vroege fase van infectie (wanneer granulomen ontstaan), werden verschillende genen die een rol spelen in macrofagen geselecteerd voor nader onderzoek. De macrofaag is een belangrijke cel aangezien deze sterk bijdraagt aan de vorming van granulomen tijdens infectie. Daarnaast werden ook genen geselecteerd waarvan tijdens eerder onderzoek naar voren kwam dat hun expressieniveau gereguleerd wordt tijdens het infectieproces; dit suggereert dat ze in dit proces een rol zouden kunnen spelen. Om te kunnen onderzoeken welke rol dit precies zou kunnen zijn, werd een techniek toegepast waarmee de aanmaak van functionerende eiwitten van deze genen tijdelijk werd uitgeschakeld. Zodoende kon het effect hiervan op de infectie worden bestudeerd. De resultaten van deze experimenten worden verder omschreven in **hoofdstuk 3**. Wanneer bleek dat uitschakeling van één van deze eiwitten leidde tot reproduceerbare resultaten waarbij de zebravisembryo's een ernstigere of juist een verminderde infectie ontwikkelden, werd dit gen beschouwd als veelbelovend voor verder onderzoek naar de exacte functie ervan.

Om een uitgebreide omschrijving te kunnen geven hoe een gastheer reageert op infectie met *Mycobacterium marinum* werd een techniek toegepast genaamd 'RNA sequencing'. Tijdens toepassing van deze techniek wordt het expressieniveau van alle genen waargenomen tijdens opeenvolgende tijdstippen van infectie. De gekozen tijdstippen varieerden van het moment direct na infectie (2 uur na infectie) tot aan latere infectiestadia wanneer de embryo's al granulomen ontwikkeld hebben (5 dagen na infectie). In **hoofdstuk 4** worden deze expressieniveaus vergeleken met opgenomen microscopiebeelden van de infectie in een embryo. Zo kan een link worden gelegd tussen opvallende expressiepatronen enerzijds en anderzijds het zichtbare beeld van interacties tussen bacteriën en immuuncellen op datzelfde tijdstip. Eén van de opvallende expressiepatronen is dat van *atf3*, een gen dat codeert voor een transcriptiefactor, een eiwit dat de expressie van andere genen reguleert. De inductie van deze transcriptiefactor tijdens infectie met *M. marinum* lijkt gunstig te zijn voor de bacterie maar niet voor de gastheer, aangezien uitschakeling van *atf3* de zebravisembryo's beter beschermt tegen infectie.

In **hoofdstuk 5** wordt de functie van één van de genen die een rol speelt in macrofagen tijdens infectie, nader bestudeerd: de scavenger-receptor 'Marco' (**macrophage receptor with collagenous structure**). Scavenger-receptoren spelen een belangrijke rol in het herkennen van bacteriën en het opnemen hiervan door macrofagen. Tijdelijke uitschakeling van *marco* in de zebravisembryo laat zien dat deze receptor niet alleen essentieel is voor het snel opnemen van *M. marinum* door de macrofaag, maar tevens

essentieel is voor de daaropvolgende ontstekingsreactie.

Nadat de macrofaag *M. marinum* heeft opgegeten is de bacterie in staat om de natuurlijke vernietigingsmechanismen van de macrofaag te ontlopen. Zodoende kan de bacterie door blijven groeien binnenin deze cel. Op dat moment komt een ander verdedigingsmechanisme van de macrofaag in actie, namelijk de porie-vormende Mpeg1 en Mpeg1.2 eiwitten (**m**acrophage **e**xpressed gene 1). **Hoofdstuk 6** laat zien dat beide Mpeg1 eiwitten antibacteriële functies hebben, zowel tijdens infectie met *M. marinum* als met *S. typhimurium*.

In **hoofdstuk 7** worden de bevindingen uit dit proefschrift samengevat en bediscussieerd. De nieuwe inzichten die verkregen werden door toepassing van het zebravismodel, en betrekking hebben op gunstige én ongunstige mechanismen tijdens infectie, dragen bij aan een sterke uitbreiding van onze kennis over het aangeboren immuunsysteem.

