



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chemokine signaling in innate immunity of zebrafish embryos

Cui, C.

Citation

Cui, C. (2012, December 20). *Chemokine signaling in innate immunity of zebrafish embryos*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20364>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20364>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20364> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Cui, Chao

Title: Chemokine signaling in innate immunity of zebrafish embryos

Issue Date: 2012-12-20

Samenvatting

Chemokinen vormen een familie van kleine chemotactische cytokinen (8–15 kDa) die de migratie sturen van celtypen met de corresponderende receptoren. Chemokinen kunnen worden onderverdeeld in vier groepen (CXC, CC, C, and CX3C) afhankelijk van de aanwezigheid en positie van geconserveerde cysteine-residuen. Ze staan het meest bekend om hun functies bij de ontwikkeling en activering van het immuunsysteem. Recentelijk is het zebravisembryomodel in opkomst gekomen als een belangrijk platform om de functie van het aangeboren immuunsysteem bij infectieziekten te bestuderen. Het feit dat er een duidelijk tijdsverschil is tussen de ontwikkeling van aangeboren en adaptieve componenten van het immuunsysteem maakt zebravisembryo's bij uitstek geschikt voor onderzoek naar de rol van het aangeboren immuunsysteem bij gastheer-pathogeen-interacties. In dit proefschrift hebben wij infectiemodellen van *Salmonella typhimurium* en *Mycobacterium marinum* gebruikt om de signaalfuncties van CXC-chemokinen te bestuderen. De belangrijkste doelstellingen hierbij waren de identificatie van infectie-induceerbare chemokinen en de functionele analyse van een chemokinereceptor, Cxcr3.2.

In **hoofdstuk 1** geven wij een algemene introductie over het aangeboren immuunsysteem en over de methoden die gebruikt worden om verschillende celtypen van het immuunsysteem te bestuderen in zebravisembryo's. Interacties tussen embryonale immuuncellen (macrofagen en neutrofielen) en ziekteverwekkende micro-organismen kunnen uitstekend gevolgd worden in de optisch transparante embryo's. Diverse methoden zijn beschikbaar om de immuuncellen zichtbaar te maken en te isoleren, om infecties te induceren via micro-injectietechnieken, en om de effecten van gastheer-pathogeen-interacties op de immunrespons te analyseren. We beschrijven recente strategieën om systemische of lokale infecties in embryo's te induceren en bediscussiëren verschillende kwantificatiemethoden voor de progressie van infecties. We bespreken tevens microarray- en sequentietechnologieën voor het karakteriseren van genexpressieprofielen van immuuncellen en transcriptonele reacties op infecties. Tenslotte hebben wij recente functionele studies van centrale factoren in het immuunsysteem van zebravisembryos in dit hoofdstuk samengevat.

In **hoofdstuk 2** hebben wij een microarray-strategie toegepast om genen te identificeren die tot expressie komen in embryonale immuuncellen en die direct of indirect afhankelijk zijn van Spi1, een transcriptiefactor die essentieel is voor de

ontwikkeling van immuuncellen. Wij vonden een groep van 249 genen die een verlaagde expressie hadden onder condities van Spi1 knockdown en die tegelijkertijd waren verrijkt in immuuncellen die geïsoleerd waren met behulp van FACS-sortering (fluorescence-activated cell sorting) uit embryos van een transgene lijn (*spi1:GFP*). Deze groep bevatte veel bekende genen met functies in hematopoïese en ontwikkeling van het immuunsysteem en tevens nieuwe genen met immuun-gerelateerde functies. Voor vier van deze genen (*cxcr3.2*, *mfap4*, *mpeg1*, en *ptpn6*) hebben wij aangetoond dat ze specifiek zijn voor macrofagen van vroege zebravisembryo's. Bovendien hebben wij met behulp van morpholino-knockdown-experimenten laten zien dat de functie van *cxcr3.2*, een gen coderend voor een CXC-chemokine-receptor, een rol speelt bij de migratie van macrofagen naar een lokale bacteriële infectie met *Salmonella typhimurium*.

In **hoofdstuk 3** hebben wij de genfamilie van CXC-chemokinen in zebravis onderzocht en de fylogenetische verwantschappen met humane CXC-chemokinen. Uit de fylogenetische analyse bleek een grote divergentie van de CXC-chemokinen van de zebravis en de mens. Terwijl de zebravis-homologen van CXCL12 and CXCL14 het sterkst geconserveerd zijn, hebben er waarschijnlijk verschillende duplicaties plaatsgevonden van de zebravisgenen voor chemokinen die verwant zijn aan CXCL8 of aan de CXCL9/10/11-groep. Vervolgens hebben we onderzoek gedaan naar de expressie van CXC-chemokinegenen in reactie op infectie van zebravisembryo's met twee verschillende bacteriële pathogenen: *Salmonella typhimurium* and *Mycobacterium marinum*. Op grond van de resultaten hebben we twee sterk infectie-induceerbare chemokinen, Il8 en Cxcl11, geselecteerd voor eiwitzuivering met behulp van een *Pichia pastoris*-expressiesysteem. Met de gezuiverde eiwitten werden *in vivo* leukocyt-migratieassays uitgevoerd om de functie van deze chemokinen bij inflammatie te bepalen. Onze resultaten toonden aan dat Il8, één van vier zebravischemokinen homoloog aan het humane IL8-eiwit, chemoattractie regelt van neutrofielen. Bovendien bleek dat Cxcl11 de chemoattractie van macrofagen kon bewerkstelligen. Op grond van de fylogenetische analyse zou Cxcl11 een ligand kunnen zijn voor de Cxcr3.2-receptor, waarvoor in hoofdstuk 2 een functie was gepostuleerd bij de aantrekking van macrofagen naar lokale bacteriële infecties.

In **hoofdstuk 4** hebben wij ons gericht op de functionele analyse van de Cxcr3.2-receptor. We hebben een knockout-mutant van deze receptor gebruikt om het gedrag van de embryonale immuuncellen tijdens infecties te bestuderen. In overeenstemming met de resultaten van morpholino-knockdown in hoofdstuk 2, vonden wij dat de migratie van macrofagen naar lokale infecties verminderd was

ten gevolge van de knockout-mutatie. Zowel bij *S. typhimurium*-infectie als bij *M. marinum*-infectie leidde de knockout-mutatie tot onvoldoende aantrekking van macrofagen naar de plaats van infectie en een verminderde capaciteit van het embryo om deze infecties onder controle te houden. De impact van Cxcr3.2-deficiëntie was het meest opvallend bij lokale infecties van het hersenventrikel met twee verzwakte stammen van *M. marinum* (Δ RD1 en FAM53). Bij infectie van *cxcr3.2*-mutanten met deze stammen trad een sterke reductie op van de aantrekking van macrofagen die gepaard ging met extracellulaire groei van de bacteriën. Wanneer gezuiverd eiwit van het infectie-induceerbare chemokine Cxcl11 werd geïnjecteerd in het hersenventrikel trad chemoattractie van macrofagen op in wild type embryo's, maar niet in de *cxcr3.2*-mutanten. Gebaseerd op deze resultaten konden wij het chemokine Cxcl11 identificeren als een waarschijnlijke ligand van de chemokinereceptor Cxcr3.2.

In **hoofdstuk 5** bediscussiëren wij de resultaten en conclusies van ons onderzoek naar de rol van chemokinesignalen bij infectie-geïnduceerde inflammatie in zebravisembryo's. Een belangrijke stap naar een beter begrip van het chemokinesignaalnetwerk dat ten grondslag ligt aan het immuunsysteem van zebravisembryo's is de identificatie van Cxcl11-Cxcr3.2 als het eerste ligand-receptor-paar waarvoor een functie gepostuleerd kan worden bij de infectie-geïnduceerde migratie van macrofagen en de controle van lokale infecties. In aanvulling hierop rapporteren wij in hoofdstuk 5 dat het gen voor een CC-chemokinereceptor, *ccr12.3* een Spi1-afhankelijk en leukocyt-specifiek expressiepatroon heeft dat sterk lijkt op dat van *cxcr3.2*, het belangrijkste onderwerp van dit proefschrift. Bovendien geven we een breder overzicht van de expressie van chemokinereceptorgenen en genen voor andere G-eiwit-gekoppelde receptoren in immuuncellen van de zebravis op basis van RNA-Seq data van macrofagen, neutrofielen, en vroege T-cellen van zebravislarven. Deze RNA-Seq data hebben een duidelijk beeld gegeven van de primaire kandidaatgenen voor functioneel onderzoek naar de rol van chemokinereceptoren in coördinatie van het immuunsysteem tijdens de embryonale en larvale ontwikkelingsstadia van het zebravismodel.

