

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20272> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kanwal, Zakia

Title: Regulatory mechanisms of innate immune signaling in zebrafish embryos

Date: 2012-12-12

Samenvatting

Infectieziekten vormen een serieuze bedreiging voor de gezondheid, niet alleen in ontwikkelingslanden maar ook in de westerse wereld. Een goed functionerend immuunsysteem is onmisbaar voor de afweer tegen ziekteverwekkende micro-organismen. In reactie op een infectie produceren de cellen van het immuunsysteem signaalmoleculen die een ontstekingsbevorderende werking hebben. Een toename van de bloedtoevoer en aantrekking van immuuncellen tijdens een ontstekingreactie helpt om verdere verspreiding van de infectie te beperken. Dit proces moet echter zeer precies gereguleerd worden, omdat een ontsteking ook schadelijk is voor de eigen lichaamscellen. Een verstoorde regulatie van dit proces kan leiden tot auto-immuunziekten en chronische ontstekingsziekten.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de signaalmoleculen die een belangrijke rol spelen bij de regulatie van het immuunsysteem. Deze signaalmoleculen zijn sterk evolutionair geconserveerd tussen de mens en de zebravis, het modelsysteem dat wij gebruikt hebben voor het onderzoek in dit proefschrift. De transparante embryo's van de zebravis zijn zeer geschikt om de functie te bestuderen van macrofagen en neutrofielen, de eerste celtypen van het immuunsysteem die reageren op een infectie. In ons onderzoek werden zebravisembryo's geïnfecteerd met *Salmonella typhimurium* and *Mycobacterium marinum*, als model voor respectievelijk acute and chronische bacteriële infecties. Met behulp van deze infectiemodellen hebben wij verschillende regulerende factoren van het immuunsysteem onderzocht.

In **hoofdstuk 2** hebben wij het belang aangetoond van een negatieve regulator van het immuunsysteem: Ptpn6, een eiwit dat behoort tot de familie van fosfatases. Het was al bekend dat functionele defecten van dit fosfatase in de muis gepaard gaan met hevige ontstekingen en dat er in de mens een verband is met auto-immuunziekten en ontstekingsziekten. Net als bij de mens, komt het gen voor Ptpn6 in de zebravis specifiek tot expressie in de cellen van het immuunsysteem (leukocyten). Uitschakeling van dit gen in zebravisembryo's (door knockdown met morpholino's) had geen zichtbaar effect tijdens de vroege ontwikkeling, maar leidde tot een laat fenotype in larven van vijf tot zes dagen oud. Deze larven ontwikkelden oedeem en huidlaesies met een sterke infiltratie door leukocyten. Bovendien vertoonden ze een sterk verhoogde expressie van ontstekingsbevorderende (pro-inflammatoire) genen, zoals *interleukine 1b* (*il1b*) en *matrix metalloproteinase 9* (*mmp9*). Dit fenotype was onafhankelijk van de aanwezigheid van micro-organismen en kon niet onderdrukt worden door behandeling met glucocorticoïde ontstekingsremmers. Om de functie van Ptpn6 tijdens infecties te onderzoeken hebben wij ons gericht op de eerste dagen van de embryo-ontwikkeling, voorafgaand aan het optreden van het latere fenotype in de larven. In deze periode vertoonden Ptpn6-deficiënte embryo's een grotere vatbaarheid voor experimentele infecties met *S. typhimurium* en *M. marinum*. Tijdens *S. typhimurium*-infectie trad er in de Ptpn6-deficiënte embryo's een sterkere inductie op van de pro-inflammatoire genen *il1b* en *mmp9* dan bij geïnfecteerde controle-embryo's. Tijdens *M. marinum*-infectie werd eenzelfde effect van Ptpn6-deficiëntie op expressie van *mmp9* waargenomen. De

hyperinductie van deze genen had dus een negatief effect op de capaciteit van de embryo's om zich te verdedigen tegen de bacteriële infecties. Vervolgens hebben wij het *S. typhimurium*-infectiemodel gebruikt om het effect van Ptpn6-deficiëntie verder te onderzoeken met behulp van een microarray-analyse en een multiplex PCR-methode (RT-MLPA). Dit liet zien dat er bij infectie van Ptpn6-deficiënte embryo's een hyperinductie is van een grote groep van pro-inflammatoire genen en activerende transcriptiefactoren van de immuunrespons. Deze resultaten leidden tot de conclusie dat Ptpn6 functioneert als een negatieve feedback-regulator van de immuunrespons van zebravisembryo's tegen infecties. Deze functie van Ptpn6 blijkt cruciaal te zijn voor het afweermechanisme van de embryo's.

In **hoofdstuk 3** hebben wij RNA-Seq-technologie (Illumina RNA sequencing) toegepast om de expressieprofielen te bepalen van verschillende celtypen van het immuunsysteem en om de effecten van Ptpn6-deficiëntie verder te analyseren op cellulair niveau. Hiervoor hebben wij gebruik gemaakt van transgene zebravislijnen met fluorescent-gemarkeerde macrofagen (*mpeg1:egfp*), neutrofielen (*mpx:egfp*), en vroege T-cellen (*lck:egfp*). De fluorescerende cellen werden geïsoleerd uit vijf dagen oude larven met behulp van FACS-sortering (fluorescence activated cell sorting). Eerst hebben wij een robuust protocol opgezet voor RNA-isolatie, cDNA-amplificatie en RNA-Seq-analyse van zeer kleine hoeveelheden uitgangsmateriaal (4000-10000 cellen en RNA-hoeveelheden rond 100 pg). Hiermee konden wij vervolgens sets van specifieke merkers bepalen voor macrofagen, neutrofielen, en T-cellen. Hierbij hebben wij nieuwe merkers ontdekt die een hoger expressieniveau hebben dan tot nu toe bekende merkers en die daarom zeer geschikt zijn voor de ontwikkeling van nieuwe transgene lijnen of antilichamen voor de onderscheiding van verschillende typen immuuncellen in de zebravis. We hebben de RNA-Seq-technologie tevens toegepast om de reactie van het immuunsysteem op een infectie met *M. marinum* te onderzoeken. Na opname door macrofagen, veroorzaakt deze pathogeen een chronische infectie in zebravisembryo's, waarbij de geïnfecteerde macrofagen opeenhopen in granulomen. De vorming van granulomen is ook karakteristiek voor tuberculose bij de mens, veroorzaakt door de nauw verwante pathogeen *Mycobacterium tuberculosis*. Wij vonden dat de infectie met *M. marinum* een groot effect had op het expressieprofiel van macrofagen, waarbij er een sterke verlaging was van de expressieniveau's van macrofaag-specifieke merker genen en er tegelijkertijd verhoogde expressie was van genen die een mogelijke rol spelen bij de afweerreactie van de gastheer of juist bij immuunsuppressie. Onder condities van Ptpn6-deficiëntie vertoonden de geïnfecteerde cellen een extra verhoging van de expressie van genen voor matrix metalloproteinasen, waaronder *mmp9* en *mmp13a*. Bovendien was er een verhoogde expressie van *serum amyloid A (saa)*, een gen dat mogelijk de expressie van *mmp* genen reguleert. Er was ook verhoogde expressie van genen met een mogelijke anti-microbiële functie, maar dat kon niet verkomen dat Ptpn6-deficiënte embryo's vatbaarder waren voor infectie met *M. marinum*. In tegenstelling tot wat we zagen bij *S. typhimurium*-infectie (hoofdstuk 2), was er geen algemeen verhoogde expressie van pro-inflammatoire genen. Daarom concludeerden wij dat de grotere vatbaarheid van Ptpn6-deficiënte embryo's voor *M. marinum*-infectie

met name wordt veroorzaakt door een specifieke hyperinductie van *mmp*-genen, terwijl dit bij *S. typhimurium*-infectie komt door een algemene hyperinductie van pro-inflammatoire genen. De expressie van *mmp*-genen was ook verhoogd in macrofagen van ongeïnfekteerde zebravislarven met Ptpn6-deficiëntie. Dit zou een belangrijke oorzaak kunnen zijn van de spontane ontstekingsreacties die optreden in deze larven (hoofdstuk 2).

In **hoofdstuk 4** hebben we de functie van microRNAs (miRNAs) onderzocht die een mogelijke rol spelen bij post-transcriptionele regulatie van het immuunsysteem tijdens infecties. Het onderzoek was gericht op microRNA-146a and microRNA-146b (miR-146a/b), twee nauw verwante leden van de miRNA-146-familie, die sterk geconserveerd is tussen de mens en de zebravis. Een veranderde expressie van miR-146a en b is vaak in verband gebracht met ontstekingsziekten en kwaadaardige tumoren. Op grond van eerder onderzoek in humane cellen en muizen was gepostuleerd dat miR-146a en b functioneren als negatieve feedback-regulatoren van het immuunsysteem via afbraak van de mRNA's van twee centrale signaalmoleculen, IRAK1 and TRAF6. Overeenkomstig met eerder microarraydata van onze groep vonden wij met behulp van kwantitatieve PCR dat de expressie van miR-146a en b in zebravis induceerbaar is door infectie met *S. typhimurium* en *M. marinum*. Bovendien konden wij aantonen dat deze infectie-inductie grotendeels afhankelijk is van een Myd88/Traf6-signalroute. Net als bij het onderzoek naar Ptpn6 hebben wij gebruik gemaakt van morpholino-knockdown om de functie van miR-146a/b in zebravisembryo's te onderzoeken. Deficiëntie van miR-146a/b had geen effect op de ontwikkeling of differentiatie van leukocyten in de zebravisembryo's. Ook bleek uit RNA-Seq-analyse dat er weinig effect was van miR-146a/b-deficiëntie op genexpressie, zowel in ongeïnfekteerde embryoes als tijdens *S. typhimurium*-infectie. Een opvallend verschil met deficiëntie van Ptpn6 was dat er bij miR-146a/b-deficiëntie geen algemene hyperinductie van pro-inflammatoire genen optrad tijdens *S. typhimurium*-infectie. Het enige pro-inflammatoire gen met een enigszins verhoogde inductie bij miR-146a/b-deficiëntie was *mmp9*. Wel vonden we aanwijzingen in de RNA-Seq-analyse voor een effect van miR-146a/b-deficiëntie op lipidetransporters (apolipoproteïnen) tijdens *S. typhimurium*-infectie. Dit is een interessante observatie, aangezien veel studies een verband hebben gelegd tussen lipidetransport en immuniteit en aangezien verschillende ontstekingsziekten zijn geassocieerd met een ongecontroleerde ophoping van lipiden. Toekomstig onderzoek in zebravis-infectiemodellen zou kunnen bijdragen om de functie van de miR-146-familie in lipide-afhankelijke ontstekingsprocessen verder op te helderen. Deficiëntie van miR-146a/b had geen meetbaar effect op de vatbaarheid van zebravisembryo's voor infectie met *S. typhimurium*, maar injectie van *M. marinum*-bacteriën resulteerde in een versnelde vorming van granulomen en een progressiever verloop van de infectie. Met gebruik van specifieke morpholino's voor miR-146a en voor miR-146b bleek dat de versnelde granuloomvorming vooral werd veroorzaakt door deficiëntie van miR-146b. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de versnelde granuloomvorming onder condities van miR-146b-deficiëntie ook gepaard gaat met verhoogde *mmp9* expressie, net zoals bij Ptpn6-deficiëntie.

Conclusies: Het onderzoek in dit proefschrift heeft nieuwe inzichten opgeleverd in de mechanismen die betrokken zijn bij de regulatie van de immuunreactie tegen infecties in zebravisembryo's. Met cel-specifieke expressieprofileringen hebben wij bovendien nieuwe merkgenen ontdekt waarmee verschillende celtypen van het immuunsysteem onderscheiden kunnen worden. Dit is zeer nuttige informatie omdat er een grote behoefte is aan merkers voor de ontwikkeling van nieuwe transgene lijnen (fluorescente reporters) en antilichamen voor detectie van immuuncellen. Onze functionele analyses van Ptpn6 hebben laten zien dat dit leukocyt-specifieke fosfatase betrokken is bij negatieve regulatie van het immuunsysteem en dat deze rol cruciaal is voor een gebalanceerde reactie van het immuunsysteem op infecties met *S. typhimurium* and *M. marinum*. Het bleek dat Ptpn6-deficiëntie specifieke effecten heeft op deze verschillende infecties. Bij *S. typhimurium*-infectie veroorzaakte Ptpn6-deficiëntie een algemene hyperinductie van pro-inflammatoire genen, wat contraproductief was omdat het de afweer tegen de infectie verslechterde. Bij *M. marinum*-infectie was een specifiek effect van Ptpn6-deficiëntie op de expressie van genen voor matrix metalloproteïnases de meest waarschijnlijke oorzaak van versnelde granuloomvorming en progressie van de infectie. Verder hebben we geconcludeerd dat Ptpn6 functioneert als een veel sterkere negatieve regulator dan infectie-induceerbare miRNAs van de miR-146-familie, die mogelijk betrokken zijn bij een subtielere "fine-tuning" van de immuunrespons. Kennis over de functies van Ptpn6 en miR-146-miRNAs heeft praktische toepasbaarheid gezien hun potentieel als therapeutische doelwitten voor ontstekingsziekten en kanker. Onze knockdown-modellen van deze negatieve regulatoren kunnen bijdragen aan grootschalige screenings voor nieuwe anti-inflammatoire en anti-microbiële medicijnen, waarvoor zebravisembryo's zeer geschikt zijn.