



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Autophagy and Lc3-associated phagocytosis in host defense against Salmonella**

Masud, S.

### **Citation**

Masud, S. (2017, October 12). *Autophagy and Lc3-associated phagocytosis in host defense against Salmonella*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/58773>

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/1887/58773>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



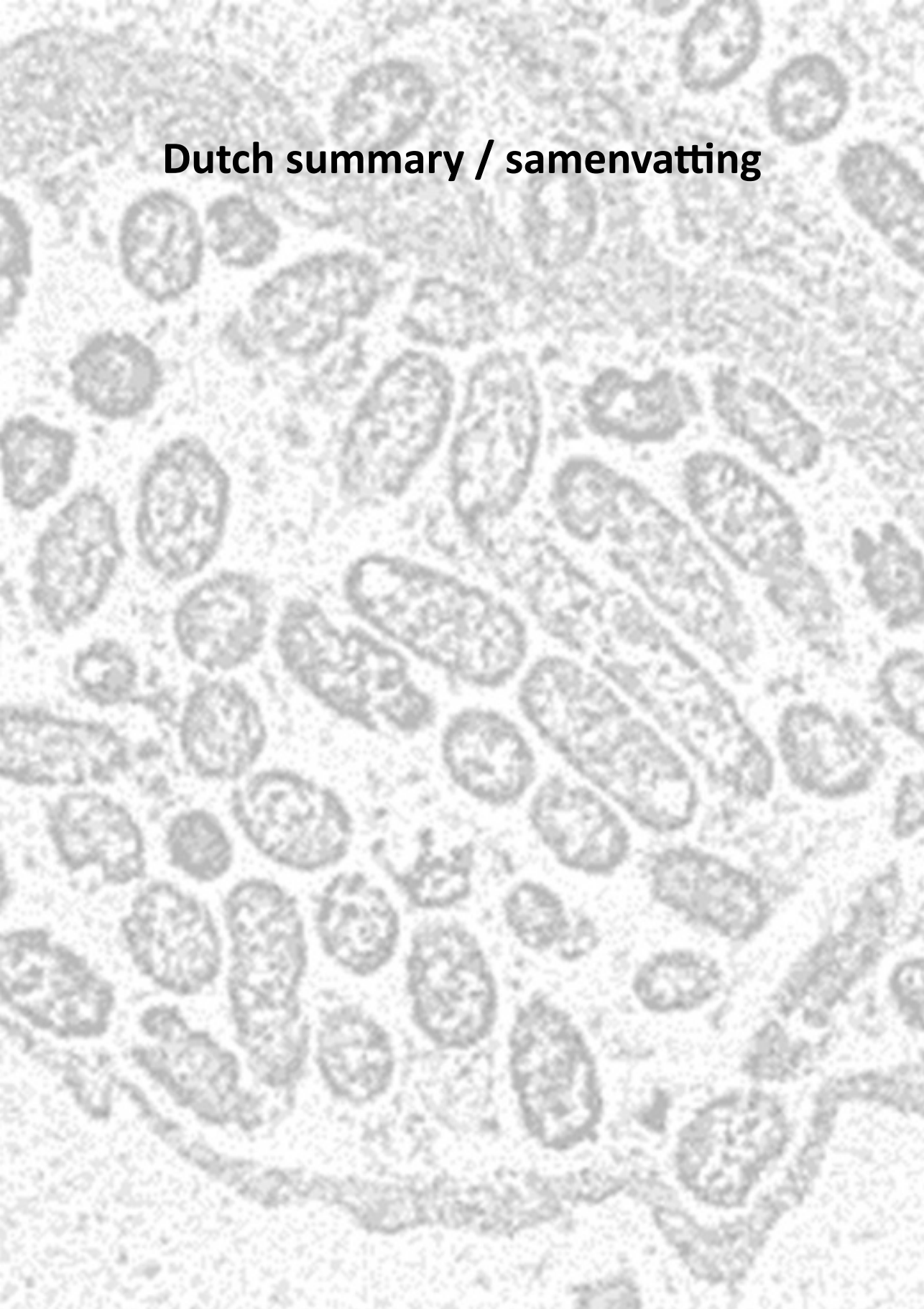
The handle <http://hdl.handle.net/1887/58773> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Masud, S.

**Title:** Autophagy and Lc3-associated phagocytosis in host defense against Salmonella

**Issue Date:** 2017-10-12

# **Dutch summary / samenvatting**



## Samenvatting

Bacteriële infectieziekten vormen nog altijd een wereldwijd gezondheidsprobleem, ook al zijn er antibiotica tegen ontwikkeld. Omdat er steeds vaker antibioticum-resistente bacteriestammen opduiken, is de urgentie om alternatieve behandelingsmethoden te vinden groot. Hierbij kan gedacht worden aan medicijnen die aangrijpen op gastheerfactoren die een rol spelen bij de afweerreacties van het immuunsysteem waaraan pathogene bacteriën weten te ontsnappen. De ontwikkeling van zulke gastheer-gerichte therapieën vereist een beter begrip van de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij gastheer-pathogeen-interacties. In dit proefschrift is de zebravis gebruikt voor onderzoek naar de rol van autofagie als afweermechanisme tegen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), een intracellulaire pathogeen die een voorname oorzaak is van besmettelijke darminfecties.

Autofagie is een fundamenteel proces dat de levensduur van cellen bevordert door beschadigde onderdelen en afvalproducten af te breken en te recyclen. Zoals besproken in **Hoofdstuk 1**, is het recentelijk duidelijk geworden dat autofagie ook een belangrijk afweermechanisme is tegen intracellulaire infecties. Farmacologische stimulatie van autofagie wordt daarom gezien als een mogelijk alternatief voor de behandeling van infecties met antibioticum-resistente bacteriën. Het zal echter nog moeten blijken of deze strategie effectief is tegen pathogenen die virulentiemechanismen bezitten om de autofagierespons van hun gastheer terug te dringen, te ontwijken of juist zodanig te manipuleren dat het hun overleving en replicatie in de gastheercel ten goede komt. Gezien de dubbele rol van autofagie als een gastheer-beschermend of een virulentie-bevorderend mechanisme, is het duidelijk dat verder onderzoek naar gastheer-pathogeen-interacties nodig is om inzicht te krijgen in de therapeutische waarde van stoffen die autofagie stimuleren.

De zebravis is een bruikbaar modelorganisme om de rol van autofagie bij de afweer tegen pathogenen te bestuderen. Onderzoek naar het immuunsysteem van de zebravis, waarvan **Hoofdstuk 2** een overzicht geeft, heeft aangetoond dat er grote overeenkomsten zijn met het immuunsysteem van de mens. De transparante embryo's van de zebravis lenen zich uitstekend voor microscopisch onderzoek, waarbij de cellen

van het aangeboren immuunsysteem (macrofagen en neutrofielen) en autofagieprocessen (gekenmerkt door accumulatie van het eiwit Lc3) met fluorescerende merkers kunnen worden gevolgd. Bovendien zijn er eenvoudige genetische technieken beschikbaar om de gastheerfactoren te bestuderen die een rol spelen bij autofagieprocessen. Voor het onderzoek in dit proefschrift kon gebruik worden gemaakt van een al beschikbaar zebrafisembryomodel voor infectie met *S. Typhimurium*.

De rol van autofagie bij afweer tegen *Salmonella*-infecties is tot nu toe voornamelijk bestudeerd in epitheelcellen, die het doelwit zijn van invasie door *Salmonella* bij darminfecties. Er is echter nog weinig bekend over de interactie van *Salmonella* met de autofagiemachinerie van macrofagen. Deze immuuncellen zijn de belangrijkste dragers van de pathogeen wanneer een *Salmonella*-infectie niet beperkt blijft tot het darmkanaal, maar systemisch wordt, zoals bij paratyfus. In **Hoofdstuk 3** is het zebrafisembryomodel gebruikt om de interactie van *S. Typhimurium* met immuuncellen tijdens een systemische infectie te bestuderen. Dit onderzoek heeft uitgewezen dat de fagocytose van levende, maar niet van dode, *Salmonella*-bacteriën gepaard gaat met de accumulatie van de fluorescentegelabelde autofagiemerker GFP-Lc3 op de blaasjes waarin de bacteriën door de immuuncellen zijn opgenomen. Hierbij werden verschillende patronen waargenomen, variërend van ringvormige tot puntvormige GFP-Lc3-signalen rond enkele bacteriën of rond clusters van bacteriën. Ook met behulp van transmissie-electronmicroscopie werden verschillende typen van bacteriële compartimenten gedetecteerd. De GFP-Lc3-patronen werden zowel in geïnfekteerde macrofagen als in geïnfekteerde neutrofielen waargenomen. Uit genetische modulatie van de ratio tussen deze twee celtypen bleek echter dat macrofagen het belangrijkste celtype zijn voor de Lc3-afhankelijke afweerreactie.

Hoewel Lc3 een veelgebruikte merker voor autofagie is, kan fagocytose ook gepaard gaan met Lc3-accumulatie. Dat proces wordt Lc3-geassocieerde fagocytose genoemd oftewel LAP (“Lc3-associated phagocytosis”) en is afhankelijk van een groot deel van de componenten van de autofagiemachinerie (bijvoorbeeld het Atg5-Atg12-Atg16L-complex), maar niet van alle componenten (bijvoorbeeld het Ulk1-Atg13-Fip200-complex). Bovendien fungeert het eiwit Rubicon als een remmer van autofagie, terwijl het juist essentieel is voor de inductie van LAP. Rubicon stabiliseert

NADPH-oxidase op de membraan van het fagosoom en dat is noodzakelijk voor de productie van reactieve zuurstofmoleculen oftewel ROS (“reactive oxygen species”), waardoor de accumulatie van Lc3 wordt opgewekt. Om te onderzoeken of autofagie danwel LAP het mechanisme is achter de Lc3-respons tegen *Salmonella* werd het onderzoek in **Hoofdstuk 3** vervolgd met knockdown-experimenten, waaruit bleek dat deze respons afhankelijk is van Atg5, Rubicon en NADPH-oxidase, maar onafhankelijk van Atg13. Al deze factoren, behalve Atg13, bleken ook bepalend te zijn voor de resistentie van de zebrawisgastheer tegen de infectie. Ten slotte kon aangetoond worden dat zowel Rubicon als NADPH-oxidase essentieel zijn om een *Salmonella*-biosensor voor ROS-productie te activeren. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat LAP het belangrijkste autofagie-gerelateerde proces is dat verantwoordelijk is voor de afweer van macrofagen tegen een systemische *Salmonella*-infectie.

Vervolgens werd in **Hoofdstuk 4** onderzocht welke virulentiefactoren van *Salmonella* invloed hebben op de pathogeniciteit in het zebrawismodel en op de inductie van LAP als afweerrespons. Hierbij werden vijf *Salmonella*-mutanten bestudeerd die allemaal de accumulatie van GFP-Lc3 rond gefagocyteerde bacteriën konden opwekken via een Rubicon-afhankelijk mechanisme. Stammen met mutaties in de virulentiefactoren PhoP of PurA, respectievelijk betrokken bij adaptatie aan de intracellulaire omgeving en bij het metabolisme van purines, waren minder goed in staat om zebrawisembryo's te infecteren dan de wildtype-stam. Echter, de virulentie van deze twee verzwakte stammen nam toe wanneer LAP werd uitgeschakeld door middel van genetische inhibitie van Rubicon. Het is bekend dat mutaties in factoren van de type-III-secretiesystemen (T3SS), waaronder SipB (T3SS-systeem 1) en SsrB (T3SS-systeem 2), belangrijk zijn voor invasie van en replicatie in niet-fagocytische cellen. Mutaties in deze factoren hadden echter geen invloed op de capaciteit van *Salmonella* om infectie te veroorzaken in het zebrawismodel, waarin de bacteriën actief door macrofagen gefagocyteerd worden. In tegenstelling tot de SipB-mutant, vertoonde de SsrB-mutant geen toegenomen virulentie in een Rubicon-deficiënte gastheer, wat suggereert dat effectoren van het T3SS-systeem 2 belangrijk zijn voor de intracellulaire replicatie van *Salmonella* in afwezigheid van LAP. Ten slotte bleek mutatie van FlhD, noodzakelijk voor de productie van flagellen, te resulteren in hypervirulentie van *Salmonella* in zowel wildtype-zebrawisembryo's als in Rubicon-deficiënte gas-

theren. Mutatie van FlhD resulteerde tevens in een verlaagd niveau van GFP-Lc3-accumulatie in vergelijking met de wildtype-stam, waaruit opgemaakt kan worden dat herkenning van flagellen door het aangeboren immuunsysteem van de zebravisgastheer de LAP-respons stimuleert. Deze resultaten versterken het bewijs dat het Rubicon-afhankelijke LAP-proces een belangrijk afweermechanisme is van macrofagen tegen *S. Typhimurium*.

Het membraaneiwit Dram1 is een door stress en infectie induceerbare modulator van autofagie, waarvan de genexpressie wordt aangestuurd door de transcriptiefactoren p53 en NFκB. Met behulp van een zebravis-model voor tuberculose is eerder aangetoond dat Dram1 bescherming biedt tegen de intracellulaire pathogeen *Mycobacterium marinum*. Bij deze infectie stimuleert Dram1 de p62-afhankelijke autofagie gericht tegen bacteriën die uit fagosomen ontsnapt zijn naar het cytoplasma. Het was echter nog onbekend of Dram1 ook andere autofagie-gerelateerde processen, zoals LAP, kan beïnvloeden. Het onderzoek in **Hoofdstuk 5** was erop gericht om deze vraag te beantwoorden met behulp van het systemische *Salmonella*-infectiemodel, waarin de Lc3-respons door LAP bepaald wordt. Genetische inhibitie (via morpholino-knockdown) of mutatie van het *dram1*-gen (via CRISPR/Cas9-technologie) resulteerde in een toegenomen groei van *Salmonella*-bacteriën en een verhoogde mortaliteit van de geïnfecteerde zebravisembryo's. In overeenstemming hiermee kon de replicatie van *Salmonella* en de mortaliteit van de geïnfecteerde embryo's juist beperkt worden door *dram1* tot overexpressie te brengen (via mRNA-injectie). Microscopische analyse van GFP-Lc3-accumulatie liet een sterke correlatie zien tussen de mate van LAP-inductie en het expressieniveau van *dram1*, met ongeveer 50% verlaging van GFP-Lc3-*Salmonella*-associaties bij uitschakeling van *dram1* (knockdown of mutatie) en ongeveer 30% verhoging bij overexpressie van *dram1*. Door middel van experimenten met een *Salmonella*-biosensor werd aangetoond dat ook ROS-productie in het fagosoom, wat bepalend is voor de inductie van LAP, grotendeels afwezig is in *dram1*-mutanten. Deze resultaten tonen aan dat Dram1 belangrijk is voor de afweer tegen *S. Typhimurium* en dat er een functioneel verband is tussen Dram1 en de inductie van LAP.

Zoals samengevat en bediscussieerd in **Hoofdstuk 6**, heeft het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven nieuwe inzichten opgeleverd

in de rol van de autofagiemachinerie bij afweer tegen *Salmonella*. Deze inzichten zijn in het bijzonder relevant voor de systemische stadia van *Salmonella*-infecties waarbij de pathogeen de macrofagen van de gastheer parasiteert. Het onderzoek heeft aangetoond dat een aan autofagie gerelateerd mechanisme, namelijk Lc3-geassocieerde fagocytose of kortweg LAP, aangrijpt op *Salmonella*-bacteriën wanneer deze worden opgenomen door de fagocyten, met name de macrofagen, van het zebravisembryo. Rubicon en NADPH-oxidase zijn essentiële gastheerfactoren voor deze respons. Deficiëntie in deze factoren doet de virulentie toenemen van zowel wildtype-*Salmonella* als van verzwakte stammen, waaruit blijkt dat LAP fungeert als een beschermend mechanisme van de gastheer tegen *Salmonella*-infecties. Het onderzoek heeft bovendien een nieuw functioneel verband aangetoond tussen de autofagiemodulator Dram1 en het proces van LAP-inductie. De resultaten hebben uitgewezen dat resistentie van zebravisembryo's tegen systemische *Salmonella*-infecties verbeterd kan worden door de Dram1-activiteit genetisch te verhogen. Dit is een aanmoediging voor vervolgonderzoek gericht op de identificatie van medicijnen om de autofagiemachinerie te stimuleren als therapie tegen antibioticum-resistente *Salmonella*-infecties.





