



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chemokine signaling mechanisms underlying inflammation and infection control: Insights from the zebrafish model

Sommer, F.

Citation

Sommer, F. (2020, October 15). *Chemokine signaling mechanisms underlying inflammation and infection control: Insights from the zebrafish model*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137821>

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/1887/137821>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137821> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Sommer, F.

Title: Chemokine signaling mechanisms underlying inflammation and infection control: Insights from the zebrafish model

Issue Date: 2020-10-15

Samenvatting

Macrofagen zijn immuuncellen die verschillende receptoren op hun oppervlakte dragen waarmee zij signalen uit de omgeving kunnen waarnemen en verwerken tot een effectieve reactie op ziekteverwekkende micro-organismen of weefschade. Immuuncellen worden naar ontstoken en geïnfecteerde weefsels geleid via een gradiënt van kleine signaaleiwitten die chemokinen genoemd worden. De chemokinereceptoren CXCR3 en CCR2 zijn belangrijk voor de migratie van macrofagen naar plaatsen van infectie en ontsteking, waar deze cellen bacteriën opnemen en afbreken, de ontstekingsreactie moduleren en het herstel van beschadigde weefsels bevorderen. Chemokinereceptoren en hun functies in macrofagen spelen daarom een centrale rol in het aangeboren immuunsysteem en vormen het hoofdonderwerp van het onderzoek in dit proefschrift.

De bijzonder goede toegankelijkheid voor microscopie en een scala aan moleculaire gereedschappen maken de zebravis bij uitstek geschikt als model om de reactie van macrofagen op infectie en verwonding in beeld te brengen en te onderzoeken in een levend organisme. Hierbij kunnen de macrofagen met fluorescerende eiwitten worden gemarkeerd en kunnen de chemokinereceptoren worden uitgeschakeld of tot overexpressie gebracht. Wij hebben van deze technische mogelijkheden gebruik gemaakt om de zebravishomologen van de humane CXCR3- en CCR2-receptoren te bestuderen met drie overkoepelende onderzoeksvragen: i) Wordt de migratie van macrofagen gereguleerd door een samenspel van nauwverwante chemokinereceptoren? ii) Verbinden chemokinesignaalroutes de migratie van macrofagen met hun antimicrobiële capaciteit? en iii) Welk potentieel heeft het zebravismodel voor het identificeren van nieuwe ontstekingsremmende medicijnen die aangrijpen op chemokinereceptoren.

In Hoofdstuk 1 geven wij een overzicht van de principes van signaaltransductie door chemokinereceptoren en bespreken de huidige kennis van de rol van deze receptoren onder verschillende ontstekingscondities en tijdens de ontwikkeling van zebravisembryo's. De nadruk ligt hierbij op macrofagen en neutrofielen en hun rol bij verschillende processen zoals het opruimen van microbiële indringers, de resolutie van ontstekingsreacties en het fijnregelen van de activeringsstatus van macrofagen. We beschrijven het verband tussen chemokinesignaaltransductie en de veranderingen in het cytoskelet van immuuncellen die nodig zijn voor migratie en fagocytose (opname van micro-organismen en celresten). Verder laten we zien hoe sterk de chemokinesystemen van mens en zebravis geconserveerd zijn, ondanks dat er tijdens de evolutie van vissen meerdere genduplicaties hebben plaatsgevonden. Ten slotte beschrijft dit hoofdstuk de meest relevante bijdragen van het zebravismodel aan de karakterisering van fundamentele mechanismen in de signaalnetwerken van chemokinereceptoren en hun functies tijdens tumorpro-

gressie en ontstekingsreacties opgewekt door verwonding of infectie. We onderstrepen de veelzijdigheid en robuustheid van het zebravismodel om ontwikkelingsprocessen en vroege stadia van de aangeboren immuunrespons in “real time” te bestuderen.

Hoofdstuk 2 behandelt het antagonistische samenspel tussen twee paraloge genen, *cxc3.2* en *cxc3.3*, in macrofagen van de zebravis. De chemokinereceptor Cxcr3.2 is homoloog aan de humane CXCR3-receptor en stuurt de migratie aan van macrofagen naar plaatsen van infectie of ontsteking. Cxcr3.3, daarentegen, heeft structurele en fylogenetische kenmerken van de zogenoemde atypische chemokinereceptoren die geen signalen kunnen doorgeven, maar wel chemokinen kunnen wegvangen. Daarmee reguleren ze de functie van conventionele receptoren die diezelfde chemokinen binden. In dit hoofdstuk hebben wij het functionele antagonisme van deze receptoren uitgezocht in de context van mycobacteriële infectie en wond-geïnduceerde ontsteking. Uitschakeling van de Cxcr3.2-receptor door mutatie vermindert de motiliteit van macrofagen, terwijl mutatie van Cxcr3.3 de motiliteit juist verhoogt. De verminderde motiliteit van macrofagen in *cxc3.2*-mutanten beperkt de verspreiding van intracellulaire bacteriën en heeft een beschermend effect tegen de infectie, terwijl de verhoogde motiliteit in *cxc3.3*-mutanten de verspreiding van de bacteriën bevordert met als gevolg dat de zebraisembryo's de infectie slecht onder controle kunnen houden. Ook bleek dat er bij *cxc3.2*-mutanten minder macrofagen worden aangetrokken naar verwondingen, terwijl dat er bij *cxc3.3*-mutanten juist meer zijn. Deze observaties, samen met de structuur van de receptor, suggereren dat Cxcr3.3 de functie van Cxcr3.2 reguleert door de beschikbaarheid van gedeelde liganden te beperken. Daarom resulteert de afwezigheid van Cxcr3.3 in een toename van Cxcr3.2-gestuurde macrofaagmigratie. Dit antagonistische regulatiemechanisme, voortgekomen uit diversificatie van conventionele en atypische receptorvarianten in de zebravis, is analoog aan de rol die de antagonistische splicing-varianten CXCR3A en CXCR3B spelen in de mens. Onze resultaten onderstrepen het nut van het zebravismodel voor onderzoek naar centrale mechanismen van chemokinenetwerken en de vertaling daarvan naar humane ziekten.

Celmigratie vereist de integratie van diverse extracellulaire en intracellulaire signalen die nog voor een groot deel onbekend zijn. Recent onderzoek heeft een verband gelegd tussen de functie van chemokinereceptoren tijdens chemotaxis en de cyclische beweging van lysosomen (verteringsblaasjes) van de voorzijde naar de achterzijde van migrerende cellen. **Hoofdstuk 3** belicht de relatie tussen lysosomale functie, chemotaxis en immuniteit. Het laat zien dat verschillende lysosomale genen verhoogd tot expressie komen in macrofagen met een mutatie in de chemokinereceptor Cxcr3.2. Deze macrofagen bevatten bovendien sterk zure lysosomen, die accumuleren in het voorste gedeelte van de cel en die zich tijdens chemotaxis maar zelden naar het achterste gedeelte verplaatsen. Deze veranderde eigenschappen van de lysosomen verlenen aan macrofagen van de *cxc3.2*-mutant een verhoogde capaciteit om intracellulaire bacteriën af te breken. Om

het verband tussen lysosomale functie en *cxc3.2*-mutatie te bevestigen hebben we moleculaire gereedschappen gebruikt om Transcriptiefactor EC (Tfec, een repressor van het lysosomale regulatiecomplex) te blokkeren of tot overexpressie te brengen. Overexpressie van Tfec gaf een sterke remming van de lysosomale functie en resulteerde in verminderde afbraak van intracellulaire bacteriën. Het blokkeren van Tfec, daarentegen, verbeterde de lysosomale functie en versterkte de afbraak net zoals de *cxc3.2*-mutatie. Bovendien kon het beschermende effect van de *cxc3.2*-mutatie teniet worden gedaan door overexpressie van Tfec, wat bevestigt dat het gemis van Cxcr3.2 de functie van lysosomen verandert. Ten slotte hebben wij met microscopische analyse de beweging van lysosomen gevolgd tijdens chemotaxis om het verband tussen de veranderde lysosomale functie en de motiliteit van macrofagen nader te onderzoeken. De observatie dat lysosomen bij de *cxc3.2*-mutant accumuleren in het voorste gedeelte van migrerende cellen, suggereert dat de afwezigheid van Cxcr3.2 de voor chemotaxis noodzakelijke verplaatsing van lysosomen verstoort, waarbij de efficiëntie van deze cellen om bacteriën af te breken juist toeneemt. Dit hoofdstuk legt daarmee een verband tussen chemotactische signaaltransductie en lysosomale functie in de context van verwonding en infectie. Dit illustreert het complexe netwerk van processen die geïntegreerd moeten worden ten behoeve van celmigratie en cellulaire immuniteit.

Zebravislarven worden in toenemende mate gebruikt als platform voor chemische screenings omdat ze goed doorlaatbaar zijn voor verschillende stoffen, maar ook vanwege hun snelle ontwikkeling, kleine omvang en kosteneffectieve huisvesting. Volwassen zebravisen produceren grote hoeveelheden embryo's, wat een representatieve steekproefomvang en robuuste statistische analyse garandeert. De transparantie van de embryo's en larven maakt het mogelijk om de migratie van fluorescent-gelabelde immuuncellen tijdens een ontstekingsreactie in beeld te brengen. Een bijkomend voordeel van het gebruik van zebravislarven is dat de toxiciteit van chemische stoffen eenvoudig beoordeeld kan worden op basis van overleving, ontwikkeling en morfologische afwijkingen. Eerder werk had laten zien dat een remmer van de humane CXCR3-receptor de macrofaagmigratie reduceert op eenzelfde manier als *cxc3.2*-mutatie. **Hoofdstuk 4** richt zich op een andere sleutelfactor voor macrofaagmigratie, de CCR2-receptor. In dit hoofdstuk hebben wij het potentieel van zebravislarven onderzocht als organismaal model voor de screening van humane CCR2-remmers. CCR2 is betrokken bij verschillende ontstekingsziekten en is daarom een belangrijk doelwit voor de ontwikkeling van ontstekingsremmende medicijnen. Er bestaan al wel CCR2-remmers die ontsteking onderdrukken, maar geen van deze stoffen heeft de klinische testfase bereikt. Ons onderzoek laat zien dat humane chemokinen in staat zijn om macrofaagmigratie op te wekken na injectie in zebravislarven, wat aantoont dat er een grote mate van evolutionaire conservering is tussen de chemokinesignaalroutes van de mens en de zebravis. Deze macrofaagmigratie kon onderdrukt worden door humane CCR2-remmers behorende tot zowel de orthosterische klasse (remmers die de bindingsplaats van chemokinen blokkeren) als de allosterische

klasse (remmers die de functie van de receptor blokkeren via een interactie buiten de bindingsplaats van chemokinen). Deze resultaten dienen als een proof-of-principle voor de screening van CCR-remmers met behulp van het zebravismodel. Op basis van ons onderzoek stellen wij een procedure voor om humane CCR2-remmers te evalueren in zebrawislarven, waarbij de accumulatie van macrofagen in ontstoken weefsel wordt gekwantificeerd en tegelijkertijd de toxiciteit beoordeeld om zodoende beter klinisch toepasbare stoffen te identificeren met een hoge werkzaamheid en een lage toxiciteit. Deze toepassing van het zebravismodel bij het testen van CCR2-remmers zou de ontwikkeling van ontstekingsremmende medicijnen kunnen versnellen.

Hoofdstuk 5 bespreekt de resultaten van de voorgaande hoofdstukken en plaatst het onderzoek naar chemokinesignaalroutes met het zebravismodel in een breder perspectief. We onderstrepen het belang van het beter karakteriseren en begrijpen van de regulerende mechanismen van het chemokinesysteem. Dit vraagt om een betere classificering van atypische chemokinereceptoren en hun functies. Onze resultaten over het verband tussen chemotactische signaaltransductie en de functie van lysosomen tijdens infectie en verwonding plaatsen wij in de context van recente ontwikkelingen in gerelateerde onderzoeksvelden en wij bespreken hoe verdere vooruitgang geboekt kan worden. Ten slotte presenteren wij in dit hoofdstuk preliminaire data van in vitro-assays die zouden kunnen worden verfijnd en toegepast om een uitgebreid screeningsplatform voor remmers van chemokinereceptoren te ontwikkelen. De combinatie van zebrawis- en celcultuursystemen in een dergelijk screeningsplatform zou robuuste, snelle en gedetailleerde werkzaamheids- en toxiciteitsstudies mogelijk maken.

Concluderend, dit proefschrift onderstreept het belang van chemokinesignaalroutes bij de immuunrespons en hun verband met andere cellulaire processen naast chemotaxis. Gebruikmakend van genduplicaties die zijn opgetreden tijdens de evolutie van zebrawissen, konden wij aantonen dat twee kopieën van het *cxc3*-gen een antagonistische werking hebben. Hiermee is een regulatiemechanisme ontstaan waarmee de aantrekking van macrofagen naar ontstoken weefsel nauwkeurig kan worden afgestemd. Uit microscopische analyse van de migratie van zebrawismacrofagen bleek dat een mutatie in de functionele homoloog van het humane CXCR3-gen niet alleen de celmigratie verstoort, maar ook de eigenschappen, aantallen en cellulaire locaties van lysosomen verandert. Dit nieuwe verband tussen CXCR3-gestuurde celmigratie en lysosomale functie is gekoppeld aan een verhoogde afbraakcapaciteit voor intracellulaire bacteriën. Ten slotte is het zebravismodel bruikbaar gebleken als een robuust en snel screeningsplatform voor remmers van chemokinereceptoren om tegelijkertijd de werkzaamheid en toxiciteit te beoordelen en daarmee de ontwikkeling van ontstekingsremmers efficiënter te maken.

