



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The Function of Toll-like receptor 2 in Infection and Inflammation

Hu, W.

Citation

Hu, W. (2021, December 16). *The Function of Toll-like receptor 2 in Infection and Inflammation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3247321>

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/1887/3247321>

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

Samenvatting

1. Zebravis als model om infectie- en ontstekingsziekten te bestuderen

De activering van het aangeboren immuunsysteem hangt af van de herkenning van pathogeengeassocieerde moleculaire patronen (PAMP's) van de binnendringende pathogenen door patroonherkenningsreceptoren (PRR's). PRR's zijn tevens betrokken bij de herkenning van schade-geassocieerde moleculaire patronen (DAMP's) van beschadigde weefsels bij infectie. De familie van Toll-like receptoren (TLR's) is een van de belangrijkste leden binnen de PRR-families. De ontdekking van TLR's als poortwachters om de aangeboren immuniteit te activeren heeft in 2011 de Nobelprijs voor Fysiologie of Geneeskunde toegekend gekregen. Dit heeft een explosie aan onderzoek naar de functies van TLR's bij het moduleren van een breed spectrum van fysiologische en pathologische processen veroorzaakt. TLR2 is geconserveerd binnen de meeste gewervelde dieren en speelt een belangrijke rol bij het moduleren van infectie- en ontstekingsziekten doordat het een groot aantal PAMP's en DAMP's herkent (Hoofdstuk 1). De brede functie van TLR2 maakt het een veelbelovend therapeutisch doelwit (Hoofdstuk 1). De functie van TLR2 is echter nog steeds controversieel in sommige studies en de rol ervan bij verschillende ziekten is nog steeds onduidelijk. Het is daarom van vitaal belang om verder te onderzoeken hoe TLR2-signalering functioneert in de aangeboren immunrespons van de gastheer.

Met dit doel hebben we in dit proefschrift gebruik gemaakt van het zebravismodel om de functie van Tlr2 bij ontsteking en infectie te bestuderen. Zebravislarven hebben al binnen 5 dagen na de bevruchting een functioneel aangeboren immuunsysteem, terwijl op dat moment het adaptieve immuunsysteem nog niet functioneel is. Dit maakt de zebravis een uitstekend model om de aangeboren immuniteit van gewervelde dieren te bestuderen in de afwezigheid van adaptieve immuniteit. Bovendien wordt het zebravismodel alsmaar populairder in studies vanwege het gemak van genetische manipulatie, omics-studies van grote groepen larven en live-imaging. De afgelopen tien jaar is er met behulp van het zebravismodel aanzienlijke vooruitgang geboekt bij het bestuderen van infectie- en ontstekingsziekten. Van der Vaart *et al.* ontdekten dat zebravis embryo's met een tekort aan myeloïde differentiatiefactor 88 (Myd88), een cruciale adapter voor alle TLR's behalve TLR3, vatbaarder zijn voor bacteriële infectie met pathogenen. Deze bevinding is vergelijkbaar met de conclusies uit studies van MYD88-deficiënte mutanten in menselijke celculturen *in vitro* en *in vivo*-muismodellen. Daarnaast

rapporteerden Hosseini *et al.* dat Myd88 betrokken is bij het beperken van mycobacteriële groei in een zebravismodel met staartvininfectie. Yang *et al.* toonden aan dat de functie van Tlr2-signalering vergelijkbaar is tussen zebravis embryo's en zoogdiercellen. In beide systemen reguleert TLR2 de expressie van een vergelijkbare set immuun genen na de systemische stimulatie door het synthetische lipopeptide-ligand Pam3CSK4. Deze studies hebben de weg vrijgemaakt om de functie van Tlr2 in het zebravismodel verder te onderzoeken. In Hoofdstuk 2 hebben we de functie van *tlr2* in de afweer van zebravissen tegen *Mycobacterium marinum*-infectie bestudeerd door de fenotypes bij infectie en de corresponderende transcriptoom veranderingen te meten. In Hoofdstuk 3 hebben we onderzocht hoe Tlr2 en Myd88 het migratiegedrag van leukocyten reguleren in afwezigheid van een infectie, maar met weefselbeschadiging, door gebruik te maken van een zebravisstaartwondmodel. In Hoofdstuk 4 hebben we de functie van *tlr2* bij infectie met *Mycobacterium avium* bestudeerd door het te vergelijken met *M. marinum* infectie, met speciale aandacht voor het responsieve celmigratie gedrag.

2. Tlr2 speelt een rol bij de afweer tegen mycobacteriële infectie bij zebravislarven

In verschillende studies is gemeld dat TLR2-polymorfismen de gevoeligheid voor mycobacteriële infectie in de menselijke populatie verhogen, al is er een klein aantal studies die geen effect van TLR2-polymorfismen hebben gevonden (Hoofdstuk 1). Daarnaast is er nog steeds controverse over de rol van TLR2 in de afweer van de gastheer tegen *Mycobacterium tuberculosis* in verschillende knaagdierstudies (Hoofdstuk 1). In hoofdstuk 2 hebben we daarom een *tlr2* zebravismutant gecreëerd om de functie van Tlr2 in de aangeboren immuunafweer tijdens mycobacteriële infectie te bestuderen. Om het effect van *tlr2*-mutatie te karakteriseren, vergeleken we eerst het transcriptoom van homozygoot mutante larven met dat van heterozygote larven zonder infectie. We vonden verschillen in de genexpressieprofielen van *tlr2*^{-/-} zebravislarven en controle -larven van dezelfde ouders, zoals verschillend tot expressie gebrachte genen die betrokken zijn bij glycolyse (Hoofdstuk 2, Figuur 2 en S3). Dit resultaat komt overeen met een eerdere studie in het menselijke in vitro model en *in vivo* muismodel die aantoonde dat TLR2 een sleutelrol speelt bij het omschakelen van het cellulaire metabolisme van de gastheer naar aerobe glycolyse na *M. tuberculosis*-infectie. Een eerdere zebravisstudie in ons laboratorium suggereerde hiermee in overeenstemming dat ook MyD88 een rol speelt in het metabolisme. Bovendien toonde deze studie aan dat Tlr2 en zijn adapter MyD88 cruciaal zijn voor de reactie van de gastheer op het microbioom. Dit geeft aan dat de

verschillende genexpressieprofielen die we in de *tlr2*-mutant vonden, worden veroorzaakt door een disfunctionele reactie op het microbioom.

Om de rol van Tlr2 in de afweer tegen *M. marinum*-infectie bij zebravissen te bestuderen, injecteerden we deze bacteriën in mutanten zonder functioneel *tlr2* en homo- en heterozygote blarven van dezelfde ouders. We ontdekten dat de bacteriële belasting significant hoger was in *tlr2*-mutanten en vergezeld ging met een hogere extracellulaire bacteriële belasting en minder granulomen dan in *tlr2*^{+/+} en wildtype larven op 4 dpi (Hoofdstuk 2, Figuur 3 en 4). Dit resultaat is vergelijkbaar met eerdere studies bij muizen die een functie van Tlr2 in de verdediging van de zebravistgastheer laten zien. Bovendien toonde onze transcriptoom analyse aan dat het aantal opwaartse en neerwaartse gereguleerde genen als reactie op infectie sterk verminderd was in geïnfecteerde *tlr2* mutante zebravissen in vergelijking met de heterozygote controlevisen van dezelfde ouders (Hoofdstuk 2, Figuur 5-7). Bovendien vonden we dat veel signaalroutes waarvan is aangetoond dat ze verband houden met tuberculose bij mensen, differentieel worden gereguleerd in *tlr2*-mutante zebravislarven. We ontdekten bijvoorbeeld dat de Tlr8-signaleringsroute sterk werd beïnvloed, wat aangeeft dat Tlr2-signalering verband houdt met de functie van Tlr8 (hoofdstuk 2, figuur S10). Bovendien werden de genen van de vitamine D-receptorroute neerwaarts gereguleerd in *tlr2*-mutante zebravissen. Het is aangetoond dat vitamine D een belangrijke rol speelt bij de bestrijding van tuberculose-infectie. Daarom kan de hypergevoeligheid van *tlr2*-mutanten voor *M. marinum*-infectie worden veroorzaakt door afwijkende vitamine D-signalering. Chemokines vormen de andere gencategorie die werd beïnvloed door de *tlr2*-mutatie bij *M. marinum*-infectie. In eerder werk toonden Torraca *et al.* aan dat de Cxcr3-Cxcl11-as betrokken was bij de rekrutering van macrofagen na infectie met *M. marinum* in zebravislarven [21]. In overeenstemming hiermee vonden we dat de expressieniveaus van *cxcl11aa* en *cxcl11ac* significant lager waren in de *tlr2*-mutant na infectie (Hoofdstuk 2, Figuur 5). Dit resultaat toont een duidelijk verband tussen de Tlr2-functie en chemotaxis van macrofagen.

3. Nieuwe inzichten in Tlr2-functies bij het reguleren van leukocytmigratie door live-imaging

Gezien het grote aantal chemokinen dat aangestuurd wordt door Tlr2 (Hoofdstuk 2), veronderstelden we dat Tlr2 een sleutelfactor is in de controle van chemokine-expressie om celrekrutering in aangeboren immuniteit te reguleren. Om deze hypothese te testen, hebben we in Hoofdstuk 3 eerst de rol van Tlr2 en Myd88 onderzocht bij het moduleren van het

migratiegedrag van leukocyten in afwezigheid van mycobacteriële infectie. Hiervoor gebruikten we een zebravisstaartverwondingsmodel dat veel wordt gebruikt voor het screenen van ontstekingsremmende geneesmiddelen. We ontdekten dat het aantal gerekruteerde neutrofielen en macrofagen afnam in *tlr2*^{-/-} en *myd88*^{-/-} groepen in vergelijking met de wildtype individuen van dezelfde ouders (Hoofdstuk 3, Figuur 2 en 3). Vervolgens werd live-cel-imaging van het staartwondgebied in zebravissen uitgevoerd in *tlr2*- en *myd88*-mutanten en de overeenkomstige wildtype vissen van dezelfde ouders. Leukocytmigratie in de *tlr2* en *myd88* mutanten na verwonding werd geanalyseerd met behulp van kwantitatieve analyses van celmigratie sporen (Hoofdstuk 3, Figuur 4 en Tabel 1). Onze resultaten laten zien dat de *tlr2* en de *myd88* mutaties de migratie van neutrofielen die zich ver van een wond bevinden beïnvloeden door hun directionele persistentie negatief te beïnvloeden, maar niet hun migratiesnelheid (Hoofdstuk 3, Figuur 5 en 6). Van macrofagen ver van de wond was niet alleen de directionele persistentie was significant verminderd in de *tlr2* en de *myd88* mutanten, maar ook hun migratiesnelheid (Hoofdstuk 3, Figuur 7 en 8). Deze studie toont voor het eerst aan dat TLR-signalering direct betrokken is bij het sturen van het celmigratie gedrag van neutrofielen en macrofagen bij verwonding. Dit stimuleert verdere studies stimuleert, waaronder ook in andere modelsystemen.

Eerder is in infectiemodellen van muizen aangetoond dat TLR-signalering betrokken is bij het aansturen van infiltratie van neutrofielen en macrofagen in beschadigde weefsels. Bovendien is aangetoond dat Tlr2 de expressie van cytokinen en chemokinen reguleert na de herkenning van zijn liganden in zowel zebravis- als muizenmodellen (Hoofdstuk 2). Daarom kan het afwijkende migratiegedrag van leukocyten, dat werd waargenomen in *tlr2* en *myd88* mutante zebravissen, worden veroorzaakt door het onvoldoende niveau van basale transcripten voor chemokinen. Voor de staartverwonding kan het ook zijn dat DAMP's die worden afgegeven door dode cellen rond de wond niet leiden tot de afscheiding van chemokinen in afwezigheid van TLR2-signalering. High-mobility group box 1-eiwit (HMGB1) is bijvoorbeeld een veel bestudeerd endogeen gevaarsignaal dat een ontstekingsreactie induceert door zijn directe interactie met DAMP's die worden herkend door TLR2. Bovendien is beschreven dat reactieve zuurstofsoorten (ROS) betrokken zijn bij de rekrutering van leukocyten na verwonding in zebravislarven. Tevens is aangetoond dat de secretie van ROS wordt gemedieerd door TLR's na weefselbeschadiging. Het is dus interessant om verder te onderzoeken of ROS-productie in reactie op verwonding is veranderd in zebravislarven met mutaties in de *tlr2* en *myd88* genen.

4. Verschillen tussen tbc en NTM-infecties geleerd uit zebravisstudies

Niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) infectieziekten worden gedefinieerd als ziekten veroorzaakt door andere mycobacteriële pathogenen dan *M. tuberculosis* en *Mycobacterium leprae*. Naast TBC hebben NTM-infectieziekten de laatste tijd veel aandacht gekregen omdat de prevalentie ervan sinds 2000 sterk is toegenomen. Hoewel er behandelingen zijn voor NTM-infectieziekten, is de behandelingsduur lang en komen multiresistente gevallen frequent voor. Het is dus dringend nodig om nieuwe preventie- en therapeutische strategieën te ontdekken voor patiënten besmet met NTM. In Hoofdstuk 4 hebben we zebravislarven gebruikt om een infectiemodel van *M. avium* te ontwikkelen en vervolgens *M. avium*-infectie in larven gekarakteriseerd door het te vergelijken met *M. marinum*-infectie, een populair model van tuberculose-infectie. Eerder is gemeld dat de aangeboren afweer tegen NTM-infectie voornamelijk gemedieerd wordt door de TLR-signaleringsroute. Daarom hebben we eerst de transcriptoom profielen van de gastheer in reactie op infectie vergeleken, specifiek met betrekking tot TLR-signalering. Vervolgens hebben we de functie van toll-like receptorsignalering na infectie met *M. marinum* en *M. avium* onderzocht om de functie van Tlr2 bij infectie met deze twee verschillende bacteriën te vergelijken.

We vonden dat *M. marinum* infectie virulenter is dan *M. avium* infectie in zebravislarven (Hoofdstuk 4, Figuur 1). Bovendien vonden we dat *M. avium* stand houdt in de macrofagen met minder extracellulaire koorden vergeleken met *M. marinum* (Hoofdstuk 4, Figuur 2). Extracellulaire koordvorming is een *in vivo* morfologie van mycobacteriën vergezeld van necrotische macrofagen en extracellulair replicerende bacteriën die fagocytose voorkomen vanwege de grootte van de clusters. Bacteriële koordvorming is een pathogeen kenmerk dat geassocieerd is met hypervirulentie bij *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* en *M. chelonae*. De observatie dat met *M. marinum* geïnfecteerde larven meer extracellulaire koorden vertonen, kan dus een kenmerk zijn van de hogere letaliteit en bacteriegroei als gevolg van *M. marinum*-infectie. Om de lagere virulentie van de *M. avium*-infectie te verklaren en om genetische markers te verkrijgen voor verdere studies, voerden we RNAseq-deep sequencing uit om het hele transcriptoom profiel in het *M. avium*-infectiemodel te bestuderen en het op een systemisch niveau te vergelijken met dat van het *M. marinum*-infectiemodel.

We vonden dat *M. avium* een duidelijke transcriptoom respons heeft in vergelijking met *M. marinum*, vooral met betrekking tot de regulatie van de volgende gencategorieën:

Appendix

autofagieregulatoren, matrixremodellering en cytokinen en chemokinen (Hoofdstuk 4, Figuur 3 en 4). In de categorie van cytokinen, chemokinen en hun receptoren werden meer genen gedownreguleerd specifiek in de *M. avium*-infectiegroep, zoals *il1rga*, *ccr9b*, *cxcr4b*, *ccr6b*, *cxcl11.7*, *ccl36.1*, *cxcl12.b* en *ccl33.3* (Hoofdstuk 4, Figuur 4). Opgemerkt moet worden dat de *Cxcr4b* / *Cxcl12*-signalering, die gerelateerd is aan HIV-pathogenese, tumor-geïnduceerde angiogenese en door mycobacteriën geïnduceerde angiogenese, werd gedownreguleerd in de *M. avium*-infectiegroep. Verder is aangetoond dat CXCR4/CXCL12-signalering de leukocytenanttransport naar ontstekingsplaatsen ondersteunt, evenals CXCL11-signalering, die de rekrutering van macrofagen bij mycobacteriële infectie bemiddelt. Daarom veronderstellen we dat het migratiegedrag van macrofagen en neutrofielen anders kan zijn in zebravislarven na infectie met verschillende NTM-soorten.

Er is aangetoond dat leukocytmigratie belangrijk is voor het opruimen van bacteriën, het inperken alsook verspreiden van bacteriën, en het vormen van granulomen in de vroege mycobacteriële infectieuze stadia. In voorgaande hoofdstukken hebben we aangetoond dat Tlr2 een belangrijke rol speelt in de afweer tegen *M. marinum* infectie (Hoofdstuk 2). Verder vonden we dat Tlr2 betrokken is bij het reguleren van het gedrag van macrofagen en neutrofielen na beschadiging van de staart (Hoofdstuk 3). Tlr2 zou dus ook kunnen deelnemen aan de regulatie van het migratiegedrag van macrofagen en neutrofielen naar de plek van mycobacteriële infectie. Om de rol van Tlr2 in de regulatie van de migratie van macrofagen en neutrofielen te beoordelen, hebben we een staartvininfectiemodel toegepast in Hoofdstuk 4, dat eerder is beschreven. Hierbij werden bacteriën van ofwel de *M. marinum*-stam Mma20 ofwel de *M. avium*-stam MAC 101 geïnjecteerd 3 dagen na de bevruchting (dpf) in larven met *tlr2*^{+/+} *Tg* (*mpeg1:mCherry-F*); *TgBAC* (*mpx: EGFP*) en *tlr2*^{-/-} *Tg* (*mpeg1:mCherry -F*); *TgBAC* (*mpx: EGFP*) genotype (Hoofdstuk 4, Figuur 7). We concluderen dat macrofagen een belangrijke rol spelen in de respons op beide mycobacteriële infecties omdat er meer gerekruteerde macrofagen werden waargenomen in het geïnfecteerde gebied (Hoofdstuk 4, Figuur 8). De migratiesnelheid van macrofagen is hoger naar Mma20-infectieplaatsen (Hoofdstuk 4, Figuur 8). We vonden dat neutrofielen sneller bewogen in *tlr2* wildtype larven dan in *tlr2* mutanten na Mma20 injectie, terwijl *tlr2* deficiëntie geen invloed had op de migratie van neutrofielen na MAC101 injectie (Hoofdstuk 4, Figuur 8). Dit veranderde leukocytingedrag suggereert dat chemokine-expressieprofielen anders kunnen zijn in *tlr2*-mutante zebravissen na infectie door mycobacteriële soorten.

5. Perspectieven voor toekomstige studies

5.1 Het onderzoek naar interacties tussen gastheer en mycobacteriën met behulp van zebravislarven

In Hoofdstuk 4 hebben we eerst een *M. avium* infectiemodel ontwikkeld in zebravissen dat het mogelijk maakt om de gastheer en *M. avium* interacties *in vivo* direct te observeren. Met dit model hebben we verschillende fenotypes van granuloma-achtige clusters waargenomen in zebravislarven geïnfecteerd met verschillende mycobacteriën (Hoofdstuk 4, Figuur 2). Verder toonde de transcriptoom analyse aan dat de expressie van de genen die behoren tot de categorie van autofagieregulator genen significant werd beïnvloed in met *M. avium* geïnfecteerde zebravislarven (Hoofdstuk 4, Figuur 4). Daarom is het interessant om de autofagie respons en ultrastructuur van granulomen als gevolg van infectie door verschillende soorten mycobacteriële clusters te vergelijken. Voor dit doel zullen we in de nabije toekomst transmissie-elektronenmicroscopie (TEM) en 3D block-face scanning elektronenmicroscopie toepassen (blok-face SEM).

Daarnaast vonden we in Hoofdstuk 4 dat Tlr2 betrokken is bij de regulatie van de migratie van macrofagen en neutrofielen als reactie op infectie. Interessant is dat de resultaten van celtracking suggereren dat *tlr2* de macrofagen en neutrofielen op verschillende manieren reguleert na infectie door verschillende mycobacteriële soorten. Om verklaringen te verkrijgen voor verdere studies van het effect van de *tlr2*-mutatie op mycobacteriële infectie, zullen we in de toekomst onderzoeken of verschillen in expressieprofielen van chemokinen kunnen worden waargenomen in het vroege infectiestadium. We zouden ook willen onderzoeken of de veranderingen in het migratiegedrag van leukocyten in Tlr2-mutanten te wijten zijn aan veranderingen in signalen afkomstig van de infectieplaats of dat ze worden veroorzaakt door celautonome defecten in het migrerend vermogen van de myeloïde cellen in de *tlr2*-mutant. We zullen daarom celtransplantatie technieken toepassen om de niet-intrinsieke en intrinsieke functies van myeloïde cellen in de *tlr2*-mutant na verwonding en mycobacteriële infectie te onderzoeken.

5.2 Geautomatiseerde verwerking van live-beeldvorming van zebravissen en wiskundige modellering

In Hoofdstuk 3 en Hoofdstuk 4 hebben we een groot aantal celtracking experimenten uitgevoerd om celmigratie gedrag te kwantificeren. Celmigratie is een belangrijke fysiologische parameter

Appendix

voor veel pathologische processen, waaronder ontstekingsreacties, immuunafweer en metastase van kwaadaardige tumorcellen. Tracking van individuele cellen met behulp van confocale real time beeldvorming is een van de meest populaire methoden om celmigratie te analyseren. Met de ontwikkeling van confocale laser scanning microscopie is het gemakkelijker om enorme hoeveelheden live beeldgegevens te verkrijgen. Er zijn echter veel bioinformatische stappen vereist die moeten worden uitgevoerd na de verwerving van beeldvorming. Deze omvatten de verwerking van grote datasets, het segmenteren van celmigratie trajecten, visualisatie en kwantificatie van de trajecten, en belangrijker nog, de interpretatie van de biologische betekenis van de grote datasets. Momenteel is handmatige gegevensanalyse nog steeds vereist om geautomatiseerde gegevensanalyse te ondersteunen. Bovendien blijft de beschikbaarheid van gebruiksvriendelijke softwareprogramma's nog steeds achter bij de eisen van onderzoekers in het laboratorium.

Sommige recente beoordelingen hebben de beschikbare commerciële en gratis software of plug-ins voor live-beeldverwerking in celmigratie studies in detail samengevat. De TrackMate-plugin voor ImageJ-software (NIH, Bethesda, MD, VS), Volocity (Improvision; PerkinElmer Life and Analytical Sciences) en IMARIS (Bitplane) worden veel gebruikt in zebnavisstudies. Toch kiezen nog steeds een vrij groot aantal onderzoekers voor handmatige trackingmethoden voor in vivo celtracking van de zebnavis, zoals de ManualTrack-plugin of de MTrackJ-plugin voor ImageJ-software. Dit komt omdat de meeste software is ontworpen voor het volgen van beweging van grote deeltjes of in vitro celmigratie. De vorm van cellen in vivo is echter onregelmatig, wat de segmentatie van de trajecten bemoeilijkt en vaak resulteert in over segmentatie. Het niet correct segmenteren van de trajecten van cellen is de belangrijkste reden voor fouten in de tracking. Voorbeelden van fouten zijn dat de trajectuitvoer van de software niet van een en dezelfde cel afkomstig is of dat het gevolgde traject in verschillende delen is onderbroken. Bovendien is de beweging van cellen in vivo ingewikkelder dan in vitro, vooral tijdens dynamische immuun responsen. Modelleren van celmigratie in vivo is niet alleen gebaseerd op Brownse beweging of autoregressieve beweging, maar moet een combinatie van meerdere complexe bewegingen aannemen. Enkele trackingalgoritmen in sommige commerciële softwareprogramma's resulteren in trackingfouten, wat de kwantificatie van het traject onbetrouwbaar maakt. Daarom is het noodzakelijk om nieuwe algoritmemodellen vast te stellen op basis van in vivo bewegingen van cellen in een specifieke situatie. In Hoofdstuk 3 onderzochten we het celmigratie gedrag dat wordt gereguleerd door Toll-like receptorsignalering in staartver wonde zebnavislarven door middel van een handmatige

trackingmethode. Deze handmatige trackinggegevens bieden een solide basis, die de weg vrijmaakt om betere cel tracking-plugin-ins te ontwikkelen voor in vivo cel trackingstudies bij zebravislarven. Daarom zijn we van plan om verder geoptimaliseerde automatische trackingmethoden te ontwikkelen op basis van de grote datasets in hoofdstuk 3.

Om de mechanistische basis van de verschillen in cel migratiegedrag te bestuderen, kunnen wiskundige modellen nieuwe inzichten verschaffen. Partiële differentiaalvergelijkingen (PDE's) kunnen chemokine- en ROS-gradiënten modelleren. Deze kunnen worden opgenomen in cel chemotaxis-modellen, zoals random walk-modellen, faseveldmodellen of het Cellular Potts-model, met verschillende gradaties van cel resolutie, om leukocytmigratie te bestuderen. Dergelijke modellen kunnen kwantitatieve inzichten verschaffen in hoe chemokinen en ROS-gradiënten het migratiegedrag van de leukocyten beïnvloeden, en hoe de cellen deze gradiënten veranderen door chemokines te binden of uit te scheiden of door ROS te absorberen en te metaboliseren waarvan bekend is dat het de robuustheid van chemotaxis beïnvloed. Met behulp van Bayesiaanse inferentie op trackinggegevens kan men een aantal chemotaxisparameters afleiden, zoals de stroomsnelheid, diffusiecoëfficiënt en productietijd van de chemoattractant.

6. Conclusie

Een breed begrip van het aangeboren immuunsysteem is belangrijk voor gastheergerichte benaderingen voor de behandeling van ziekten. In dit proefschrift hebben we aangetoond dat Tlr2 een cruciale rol speelt in het aangeboren immuunsysteem van de gastheer. In Hoofdstuk 2 laten we de rol van Tlr2-signalering in de afweer van de gastheer tegen infectie op transcriptoom niveau en cellulair niveau zien door *M. marinum*-infectie in een *tlr2*-mutant te bestuderen. Bovendien bleek de *tlr2*^{-/-} mutante zebravisstam beschreven in Hoofdstuk 2 zeer nuttig te zijn voor de studie van aangeboren immuun mechanismen die ten grondslag liggen aan mycobacteriële infectie. In Hoofdstuk 3 hebben we gevonden dat *tlr2* en *myd88* betrokken zijn bij reacties op staartverwonding door het gedrag en de snelheid van leukocytmigratie *in vivo* te reguleren. De grote datasets verkregen uit hoofdstuk 3 zullen verder worden gebruikt voor het ontwikkelen van nieuwe cel tracking algoritmen en wiskundige modellering. In Hoofdstuk 4 hebben we een nieuw *M. avium* infectiemodel in de zebravis gekarakteriseerd dat verder kan worden gebruikt om de interactie tussen de gastheer en NTM-bacteriën te bestuderen.

