



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulation of autophagy-related mechanisms during bacterial infection

Xie, J.

Citation

Xie, J. (2023, December 5). *Regulation of autophagy-related mechanisms during bacterial infection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3665695>

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/1887/3665695>

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

Nederlandse samenvatting

Autofagie is een afbraakmechanisme dat de homeostase van cellen handhaaft. Hierbij worden disfunctionele celcomponenten, zoals verkeerd gevouwen eiwitten of beschadigde organellen, opgenomen in blaasjes (vesikels) die autofagosomen worden genoemd. Autofagosomen leveren hun inhoud af aan lysosomen, de organellen waarin afbraakprocessen plaatsvinden. Autofagie is ook een cruciaal onderdeel van het aangeboren immuunsysteem (**Hoofdstuk 1**). Antibacteriële autofagie, ook wel bekend als xenofagie, speelt een rol in de afweer tegen diverse intracellulaire pathogenen, zoals *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* en *Shigella flexneri*. Normaal gesproken worden dergelijke pathogenen tijdens een infectie eerst door een macrofaag of door een andere gastheercel opgenomen in een vesikel via fagocytose en vervolgens afgeleverd aan het lysosoom voor afbraak. Daarmee vormt fagocytose de eerste verdedigingslinie van de macrofaag tegen bacteriële infectie. Echter, verschillende intracellulaire pathogenen kunnen in de gastheercel overleven, onder andere door het blokkeren van stappen in de fagocytoseroute om daarmee de antimicrobiële mechanismen van het lysosoom te vermijden. Bovendien veroorzaken deze pathogenen vaak schade aan het membraan van het vesikel waarin ze zijn opgenomen. Op die manier kunnen deze pathogenen het cytosol van de cel binnendringen, waar ze vervolgens worden herkend door de autofagiemachinerie, wat een tweede verdedigingslinie biedt om dergelijke pathogenen naar lysosomen te leiden voor afbraak. Om die reden zullen succesvolle intracellulaire pathogenen veelal zijn uitgerust met virulentiefactoren om zich kunnen te verweren tegen autofagie.

Autofagie wordt gereguleerd door een grote groep eiwitten, waaronder het lysosomale eiwit Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 (DRAM1). Het gen dat codeert voor DRAM1 wordt geïnduceerd door stress en infectie. DRAM1 was de in eerste instantie beschreven als een autofagiemodulator die geïnduceerd wordt door transcriptiefactor p53 bij UV-schade, wat leidt tot apoptose. In ons laboratorium werd een nieuwe link tussen DRAM1 en het immuunsysteem ontdekt, onafhankelijk van p53. Met behulp van de zebrafish en menselijke macrofagen als modelsystemen, werd aangetoond dat DRAM1 tijdens mycobacteriële infectie wordt geïnduceerd door het adaptoreiwit MYD88 en de transcriptiefactor NF- κ B, beide onderdeel van de Toll-like receptor-siginaaltransductieroute die cruciaal is voor pathogeenherkenning. Verder onderzoek naar de homoloog van DRAM1 in zebrafissen (Dram1) toonde aan dat dit eiwit een belangrijke rol heeft in het stimuleren van

autofagie als verdedigingsmechanisme tegen mycobacteriële infectie. Met behulp zebravisembryo's met een mutatie in het *dram1*-gen, werd bevestigd dat Dram1 nodig is om de groei van mycobacteriën binnen macrofagen te beperken. Bovendien bleek uit het onderzoek naar deze mutanten dat afwezigheid van Dram1 leidt tot verminderde activiteit van autofagie en lysosomale afbraak van mycobacteriën, met als gevolg dat de geïnfecteerde macrofagen meer celdood ondergingen. Echter, het bleef in dit eerdere onderzoek nog onduidelijk via welk mechanisme DRAM1 autofagie stimuleert om zo de bacteriën te kunnen doden. Het doel van het onderzoek in dit proefschrift was daarom om de antibacteriële mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan de functie van DRAM1.

DRAM1 bevordert LC3-geassocieerde fagocytose bij *Salmonella*-infectie

Naast mycobacteriën, kunnen ook bacteriën van het genus *Salmonella* intracellulair overleven in gastheercellen, waaronder macrofagen. Na fagocytose verblijven salmonellabacteriën in een gemodificeerd vesikel dat aangeduid wordt als de *Salmonella*-bevattende vacuole (SCV, voor *Salmonella*-containing vacuole). De salmonellabacteriën kunnen ook uit het SCV ontsnappen en het cytosol binnendringen, wat dan vervolgens weer aanzet tot autofagie (xenofagie) als afweerreactie. Daarnaast kan de autofagiemachinerie zich richten tegen salmonellabacteriën die zich nog in een fagosoom of SCV bevinden. Dit autofagie-gerelateerde proces staat bekend als LC3-geassocieerde fagocytose (LAP, voor LC3-associated phagocytosis). Het kenmerk van LAP is de koppeling van het autofagie-eiwit LC3 aan het membraan van het fagosoom of een daarvan afgeleid vesikel. Deze koppeling is afhankelijk van de productie van reactieve zuurstofcomponenten (ROS, voor Reactive Oxygen Species) binnen het vesikel. Een opvallend verschil tussen autofagie en LAP is dat LC3 wordt gekoppeld aan het dubbel membraan van autofagosomen en aan het enkel membraan van LAPosomen.

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat LAP het belangrijkste autofagie-gerelateerde mechanisme is om de groei van *Salmonella enterica* serovar Typhimurium te beperken binnen macrofagen van systemisch geïnfecteerde zebravisembryo's. In dit vervolgonderzoek, hebben we het zebravisemodel gebruikt om de mogelijke rol van DRAM1 tijdens LAP te onderzoeken (**Hoofdstuk 2**). Daarnaast hebben we een cellijn van macrofagen van de muis (RAW 264.7) gebruikt om de bevindingen ook in een zoogdiermodel te toetsen. Allereerst hebben we bevestigd dat LAP betrokken is bij de afweer tegen salmonellabacteriën, zowel in de zebravis als in RAW 264.7-

macrofagen. Deze conclusie is gebaseerd op experimenten met de stof TIPTP (2-(tetrahydroindazolyl) phenoxy-N-(thiadiazolyl) propenamide), een remmer van de interactie tussen twee eiwitten, Rubicon en NADPH-oxidase, die beide noodzakelijk zijn voor de ROS-productie tijdens LAP. Daarnaast konden we met genetische studies (uitschakeling of overexpressie) aantonen dat DRAM1/Dram1 in beide modelsystemen de LAP-afweer bevordert en daarmee een beschermende rol heeft tegen *Salmonella*-infectie (**Hoofdstuk 2**).

Een mogelijk onderliggend mechanisme voor de rol van DRAM1 tijdens LAP zou kunnen zijn dat DRAM1 de fusie tussen SCV's en lysosomen bevordert, vergelijkbaar met de rol van DRAM1 tijdens xenofagie van mycobacteriën (**Hoofdstuk 4 en 5**). Echter, onze resultaten wezen op nog een tweede mechanisme. Door gebruik te maken van salmonellabacteriën met een fluorescerende biosensor voor het detecteren van ROS-productie, hebben we kunnen aantonen dat DRAM1 bijdraagt aan een verhoging van de ROS-productie in de SCV's. Omdat de productie van ROS voorafgaat aan de rekrutering van het autofagie-eiwit LC3, betekent dit dat DRAM1 al bij een vroege stap van het LAP-proces betrokken is. Mogelijk gaat DRAM1 een interactie aan met een component van het fosfatidylinositol-kinasecomplex (PI3KC3), dat verantwoordelijk is voor aanpassingen in de compositie van membraanlipiden die het LAP-proces mogelijk maken. Een kandidaat daarvoor is het eerder genoemde Rubicon-eiwit, een negatieve regulator van autofagie, maar een positieve regulator van LAP. DRAM1 zou Rubicon kunnen vrijmaken uit het PI3KC3-complex zodat het, via interactie met NADPH-oxidase, de ROS-productie kan verhogen die nodig is voor LAP. Deze hypothese verklaart hoe DRAM1 tegelijkertijd zowel autofagie als LAP zou kunnen stimuleren.

Dram1 bevordert de afweer van zebrafisembryo's tegen *Mycobacterium marinum*, onafhankelijk van de xenofagiereceptoren p62 en Optn

De klassieke antibacteriële autofagie, oftewel xenofagie, is afhankelijk van de herkenning van pathogenen door selectieve autofagiereceptoren, zoals optineurin (Optn) of sequestosome 1 (p62). Voor ons onderzoek naar xenofagie hebben we gebruik gemaakt van *Mycobacterium marinum* (Mm), een veelgebruikt model om de pathogenese van tuberculose te bestuderen. Uit eerdere studies in ons laboratorium was gebleken dat Optn en p62 belangrijk zijn voor de afweer van zebrafisembryo's tegen Mm. Dit inspireerde ons om verder te onderzoeken hoe deze twee receptoren zich tot elkaar verhouden en hoe ze samenwerken met Dram1 in de afweer tegen Mm

(Hoofdstuk 3). Hiertoe hebben we gebruik gemaakt van al bestaande CRISPR/Cas9-mutanten in *optn*, *p62* en *dram1*, waarin we door middel van mRNA-injecties steeds een van de Optn-, p62- of Dram1-eiwitten tot overproductie hebben gebracht om zo te bestuderen in hoeverre deze eiwitten van elkaar afhankelijk zijn. Hieruit bleek allereerst dat Optn en p62 voor elkaars afwezigheid konden compenseren, aangezien overproductie van de ene receptor de infectiegevoeligheid van een mutant in de andere receptor kon tegengaan. Verder vonden we dat een dubbele mutant van *optn* en *p62* nog gevoeliger was voor Mm-infectie dan de enkele mutanten. Op basis van deze resultaten concludeerden we dat de twee xenofagiereceptoren, Optn en p62, niet van elkaar afhankelijk zijn voor hun positieve bijdrage aan de afweer tegen Mm-infectie in zebnavissen.

Omdat eerder was aangetoond dat ook Dram1 een belangrijke rol speelt in de afweer tegen Mm-infectie, rees de vraag of Dram1 nog steeds goed zou kunnen functioneren wanneer xenofagie is aangetast **(Hoofdstuk 3)**. We ontdekten dat overproductie van Dram1 kan compenseren voor deficiënties in Optn en p62, zowel in het geval van enkele als dubbele mutaties, wat aangeeft dat Dram1 niet afhankelijk is van deze receptoren voor de afweer tegen Mm. Dit compenserende effect van Dram1 betrof zowel een vermindering van de bacteriële groei als een toename van de associatie van de autofagiemarker Lc3 met de Mm-bacteriën in geïnfecteerde cellen. Andere xenofagiereceptoren, waaronder Ndp52 (waarvan het niveau in *optn/p62*-mutanten licht was verhoogd), kunnen vermoedelijk in afwezigheid van Optn en p62, nog steeds zorgen voor de opname van Mm in autofagosomen, waarna de bacteriën via een Dram1-afhankelijk mechanisme in het lysosoom worden afgeleverd. Omgekeerd zagen we dat de overproductie van Optn en p62 leidt tot een verbeterde afweer in *dram1*-mutanten. Dit is goed te verklaren aan de hand van onze resultaten in RAW 264.7-macrofagen **(Hoofdstuk 4,5)**, die laten zien dat Dram1 een stimulerende maar niet-essentiële rol speelt bij fusies tussen vesikels die nodig zijn voor de aflevering van zowel bacteriën als antimicrobiële peptiden naar lysosomen.

Samenvattend kunnen we over de functie van Optn, p62 en Dram1 concluderen dat het kritische maar beperkende factoren zijn voor de afweer tegen Mm in het zebnavismodel. Bovendien duiden onze resultaten op het bestaan van robuuste compensatiemechanismen in de aangeboren immuunrespons van de zebnavis, waarbij xenofagiereceptoren en Dram1 onafhankelijk van elkaar de antibacteriële afweer kunnen versterken.

DRAM1 bevordert de fusie van vesikels met lysosomen en de aflevering van antimicrobiële peptiden

Om een beter begrip te krijgen van de moleculaire en cellulaire functies van DRAM1, hebben we RAW 264.7-macrofagen gebruikt als cellulair infectiemodel om daarmee voort te bouwen op de eerdere resultaten van Mm-infectie in het zebravismodel. Met behulp van immunohistochemie vonden we dat DRAM1 tijdens de infectie eerst gedeeltelijk en later volledig colocaliseert met Mm-bacteriën (**Hoofdstuk 4**). Dit ging gepaard met colocalisatie van de autofagiemarker LC3, de lysosomale marker LAMP1 en de LysoTracker-kleurstof waarmee verzuring van vesikels wordt aangetoond. Deze resultaten versterkten onze hypothese dat DRAM1 een rol speelt bij het transport van mycobacteriën naar lysosomen na fagocytose of autofagie. Om deze hypothese te ondersteunen, hebben we DRAM1-deficiënte RAW 264.7-macrofagen gegenereerd door middel van lentivirale shRNA-knockdown. In lijn met onze verwachtingen, zagen we dat DRAM1-deficiëntie leidde tot verminderde colocalisatie van LC3 met Mm, waarmee bevestigd werd dat DRAM1 belangrijk is voor de respons van de autofagiemachinerie tegen Mm. Bovendien ontdekten we dat DRAM1-deficiëntie leidde tot een vermindering van colocalisatie van Mm met LysoTracker en LAMP1, wat aangeeft dat DRAM1 een belangrijke rol speelt in de verzuring van de vesikels en de aflevering van Mm aan lysosomen. Bovendien vonden we dat DRAM1-deficiëntie leidde tot hogere infectieratio's en meer celdood van geïnfecteerde cellen, waarmee het belang van DRAM1 in de afweerreactie tegen infectie verder werd ondersteund (**Hoofdstuk 4**).

Vervolgens onderzochten we of het afleveren van antimicrobiële peptiden een mogelijke manier is waarop DRAM1 pathogenen zou kunnen doden via een autofagie-afhankelijk mechanisme (**Hoofdstuk 5**). Hiertoe richtten wij onze aandacht op het autofagiesubstraat Fau, een ubiquitine-achtig eiwit dat is gefuseerd met de C-terminus van het ribosomale eiwit S30. Van Fau was eerder bekend dat het uit het cytosol wordt opgenomen in autofagosomen, en dat het na fusie met lysosomen wordt verwerkt tot neo-antimicrobiële peptiden die werkzaam zijn tegen mycobacteriën. Om te bestuderen of DRAM1 betrokken is bij de aflevering van Fau, gebruikten we een wildtype stam (WT) en een avirulente stam van Mm, bekend als Δ RD1 (Region of Difference 1). Het RD1-locus codeert zowel voor het ESX-1-systeem als de eiwitten ESAT-6 en CFP-10, die via dit systeem worden uitgescheiden. ESAT-6 is een porie-vormend eiwit dat de integriteit van het membraan van mycobacteriën-bevattende vesikels aantast, waardoor de fusie tussen deze vesikels en lysosomen wordt onderbroken. Volgens onze verwachtingen

vonden we dat WT Mm, in vergelijking tot Δ RD1 Mm, vaker colocaliseerde met galectin-3, een marker voor beschadigde membranen. Bovendien zagen we een verhoogde colocalisatie tussen WT Mm en ubiquitine, wat een indicator is voor contact van Mm met het cytosol. Fau daarentegen colocaliseerde vaker met Δ RD1 Mm, wat laat zien dat Fau kan doordringen tot bacteriën die zich in vesikels bevinden, waarmee het kan worden beschouwd als een betrouwbare marker voor de aflevering van antimicrobiële peptiden. Als toevoeging daarop vonden we dat endosomale markers (Rab5 en Rab7), evenals lysosomale markers (LAMP1 en LysoTracker), vaker colocaliseerden met Δ RD1 Mm. Dit suggereert dat fusies tussen deze verschillende typen vesikels leidt tot de aflevering van Fau aan de Mm-bevattende vesikels. Het is mogelijk dat Fau-bevattende autofagosomen fuseren met Mm-bevattende vesikels, wat vooral zal voorkomen tijdens een infectie met Δ RD1 Mm. In het geval van infectie met WT Mm, waarbij ontsnapping naar het cytosol frequent optreedt, kan Fau tijdens de xenofagie alsnog in hetzelfde compartiment als Mm terechtkomen.

Om te begrijpen of DRAM1 betrokken is bij het afleveringsproces van Fau, gebruikten we de eerder genoemde knockdowncellen. Het effect van DRAM1-deficiëntie bij infectie met WT Mm of Δ RD1 Mm leidde in beide gevallen tot een verminderde colocalisatie met zowel LC3 als Fau (**Hoofdstuk 5**). Om het onderliggende mechanisme te achterhalen onderzochten we of DRAM1 een interactie aangaat met een SNARE-eiwit, VTI1B, waarvan bekend is dat het betrokken is bij fusies tussen vesikels tijdens autofagie. Uit co-immunoprecipitatie en colocalisatie-experimenten bleek dat er inderdaad een mogelijke interactie bestaat tussen DRAM1 en VTI1B, die kan verklaren dat DRAM1 vesikelfusies bevordert en daarmee ook de aflevering van Fau aan de Mm-bevattende vesikels. Als gevolg hiervan worden de antibacteriële eigenschappen van deze vesikels versterkt. Het is bekend dat VTI1B betrokken is bij zowel de initiatie als de maturatie van autofagosomen. Daarom zou een interactie met VTI1B kunnen verklaren waarom DRAM1 zowel een stimulerend effect heeft op de vorming van autofagosomen als op de fusie van Mm-bevattende vesikels met verschillende andere typen vesikels, waaronder vroege endosomen, late endosomen, multivesiculaire lichamen en lysosomen. Inderdaad had DRAM1-deficiëntie een negatief effect op de aflevering van Fau aan alle bovengenoemde Mm-bevattende vesikels (**Hoofdstuk 5**).

Conclusie

De resultaten van dit proefschrift geven nieuwe en verbeterde inzichten in de functie van een belangrijke regulator van antibacteriële autofagie, DRAM1, een eiwit dat beschermt tegen infecties met zowel mycobacteriën als salmonellabacteriën. DRAM1 beperkt de groei van bacteriën niet alleen via het veelbeschreven mechanisme van antibacteriële autofagie (xenofagie), maar bevordert ook een autofagie-gerelateerd proces genaamd LC3-geassocieerde fagocytose oftewel LAP (**Hoofdstuk 2**). De functie van DRAM1 bij het beperken van intracellulaire bacteriële groei is onafhankelijk van de herkenning van bacteriën door xenofagiereceptoren (**Hoofdstuk 3**). Mechanistisch gezien bevordert DRAM1 de infectie-geïnduceerde activering van autofagie en LAP, evenals de maturatie van bacteriën-bevattende vesikels in beide processen (**Hoofdstuk 3, 4, 5**). Dit maturatieproces, gestimuleerd door DRAM1, omvat meerdere fusiestappen tussen vesikels die bacteriën naar lysosomen leiden (**Hoofdstuk 4, 5**). Via dit maturatieproces levert DRAM1 het cytosolische eiwit Fau aan bacteriën-bevattende vesikels, waar het dient als een substraat voor de productie van antimicrobiële peptiden (**Hoofdstuk 5**). Het onderliggende mechanisme kan worden verklaard door de ontdekking van een interactie tussen DRAM1 en het SNARE-eiwit VTI1B (**Hoofdstuk 5**). Deze vondst is een stimulans voor verder onderzoek naar de wisselwerking tussen DRAM1 en SNARE-eiwitten tijdens autofagie en LAP. In bredere zin draagt het werk in dit proefschrift bij aan lopend onderzoek naar de potentiële toepassing van autofagie-modulatie als een op de gastheer gerichte therapie tegen infectieziekten.