



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Illuminating host defence against mycobacterial infection: interactions with autophagy and LC3-associated phagocytosis

Muñoz Sánchez, S.

Citation

Muñoz Sánchez, S. (2026, February 3). *Illuminating host defence against mycobacterial infection: interactions with autophagy and LC3-associated phagocytosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4288590>

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/1887/4288590>

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

7.2 Samenvatting

Ondanks aanzienlijke vooruitgang in het begrijpen van tuberculose (TBC), zorgt de diversiteit van de ziekte ervoor dat de beëindiging van de TBC-epidemie nog ver buiten bereik is. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), de veroorzaker van TBC, heeft meerdere strategieën ontwikkeld om te overleven in gastheercellen en de immuniteit daarvan te ontwijken of ondermijnen. Daardoor is deze pathogeen uitstekend in staat om transmissie, infectie en ziekteprogressie te bevorderen. De initiële afweerreactie van de gastheer is voornamelijk afhankelijk van aangeboren immuuncellen, zoals granulocyten en macrofagen, die verschillende verdedigingsmechanismen inzetten om een *Mtb*-infectie te beperken. Deze mechanismen omvatten onder meer de opname van *Mtb* in fagosomen via fagocytose of daarvan afgeleide processen (LC3-geassocieerde fagocytose of LAP), het tegengaan van de ontsnapping van *Mtb* uit fagosomen, de opname van ontsnapte bacteriën door autofagie, celdood door apoptose en insluiting van de infectie door granuloomvorming. Gastheer en pathogeen zijn verwickeld in een complexe overlevingsstrijd, waarin hun dynamische interacties de uitkomst van de infectie bepalen: genezing, asymptomatische latente TBC of actieve TBC. Inzicht in deze interacties is essentieel voor de ontwikkeling van een verbeterde aanpak voor TBC-bestrijding. Een nauw verwante mycobacteriële pathogeen, *Mycobacterium marinum* (*Mm*), deelt belangrijke virulentiemechanismen met *Mtb* en wordt vaak gebruikt om specifieke aspecten van de gastheer–pathogeeninteractie te onderzoeken die minder toegankelijk zijn met conventionele *Mtb*-modellen. In combinatie met transparante zebravislarven, is *Mm*-infectie zeer geschikt om het gedrag van geïnfecteerde immuuncellen tijdens de beginstadia van de infectie te bestuderen.

Dit proefschrift richt zich op het vergroten van de kennis over de immunrespons van de gastheer tijdens vroege stadia van mycobacteriële infectie, met bijzondere aandacht voor de door autofagie gemedieerde afbraak van mycobacteriën. Hiervoor combineerden we chemische en genetische interventies met het zebravis–*Mm*-infectiemodel om: i) vroege gastheer–pathogeeninteracties tussen *Mm* en het autofagie-mechanisme in macrofagen te onderzoeken; ii) de rol van het lipidekinase PIKfyve te bestuderen bij autofagie van *Mm* iii) de rol van Rubcn, een belangrijke schakel tussen autofagie en LAP, in de afweer tegen mycobacteriële infectie te onderzoeken.

In **Hoofdstuk 1** wordt de moleculaire pathogenese van TB geïntroduceerd, evenals de rol van autofagie en LAP in de immunrespons tegen mycobacteriële infectie. Ook wordt het zebravis-TB-model, gebaseerd op infectie met *Mm*,

gepresenteerd als een uniek systeem om gastheer–pathogeeninteracties in een fysiologische context op het niveau van het gehele organisme te bestuderen.

Hoofdstuk 2 bespreekt hoe zebraavis-infectiemodellen bewijs hebben geleverd voor de belangrijke rol van autofagie en LAP bij de afweer tegen intracellulaire bacteriële pathogenen. Hierbij wordt gebruikt gemaakt van transgene zebraavissen met een fluorescerende variant van het eiwit LC3, een marker voor vesikels gevormd door zowel autofagie als LAP. Deze in vivo studies vergroten het begrip van autofagie-geassocieerde gastheer–pathogeeninteracties en dragen bij aan de ontwikkeling van strategieën die autofagie moduleren om specifieke pathogenen af te breken. Aanvullend onderzoek is echter nodig om de regulerende bijdrage van autofagie tijdens mycobacteriële infecties volledig te begrijpen.

Autofagie is een cruciaal mechanisme voor het behoud van cellulaire gezondheid doordat het binnengedrongen microben opruimt. Deze microben worden ingesloten in vesikels met een dubbele membraan, de zogenaamde autofagosomen, die vervolgens fuseren met lysosomen om de inhoud af te breken. **Hoofdstuk 3** beschrijft hoe we door middel van hoge-resolutie live imaging in het zebraavis–*Mm*-model de autofagierespons tegen *Mm* in vivo hebben kunnen karakteriseren, vanaf de fagocytose door macrofagen tot aan de verspreiding van de infectie door het lichaam van de zebravislarve. De staartvininfectie (TFI)-techniek maakte het mogelijk om de infectiecontext van het hele organisme te reproduceren en de intracellulaire dynamiek van LC3-associaties met *Mm* in vivo te observeren. *Mm*-clusters die waren gefagocyteerd en LC3-positieve *Mm*-bevattende vesikels konden binnen het eerste uur na infectie worden gevisualiseerd. Vier fenotypes werden beschreven: LC3-positieve puncta, grote open vesikels, compacte vesikels en samengestelde vesikels. LC3-associaties met *Mm*-vesikels waren veelal kortdurend en heterogeen. Deze waarnemingen benadrukken de fenotypische heterogeniteit van mycobacteriën binnen gastheercellen en de waarde van de TFI-techniek voor in vivo beeldvorming van subcellulaire processen.

Macrofagen vormen de eerste verdedigingslinie tegen mycobacteriële infecties. Mycobacteriën worden door macrofagen gefagocyteerd en ingesloten in een fagosoom, dat gericht is op lysosomale afbraak. Effectief transport van pathogenen vereist rijping (verzuring) van het fagosoom. Fosfoïnositiden (PtdIns) zijn cruciaal voor de vorming en rijping van fagolysosomen, waardoor de enzymen die PtdIns produceren een belangrijke rol spelen in de aangeboren immuunrespons. In **Hoofdstuk 4** wordt de betrokkenheid van de fosfoïnositidekinase PIKfyve bij mycobacteriële infecties onderzocht. PIKfyve katalyseert de vorming van PtdIns(3,5)P₂, essentieel voor de rijping

van autofagosomen en de correcte werking van lysosomen. Door het gebruik van twee chemische remmers, YM201636 en Apilimod, in het zebra-vis-*Mm*-model konden we waarnemen dat PIKfyve-remming de autofagierespons tegen mycobacteriële infectie beïnvloedt. PtdIns(3,5)P2 stimuleert namelijk de fusie van autofagosomen en lysosomen. Remming van PIKfyve resulteerde in verminderde associatie van *Mm* met de autofagie-marker LC3 en in verminderde verzuring van *Mm*-fagosomen. Daarnaast vertoonden geïnfecteerde macrofagen een verhoogde mate van celdood, wat suggereert dat PIKfyve in vroege stadia van de infectie nodig is om cellen te beschermen tegen voor de gastheer nadelige celdood. Onze resultaten tonen aan dat PIKfyve-remming de afweercapaciteit van geïnfecteerde cellen aantast door verstoorde rijping van *Mm*-bevattende vesikels in de autofagieroute en waarschijnlijk ook in de fagolysosomale route. Hiermee tonen we aan dat niet alleen manipulatie van centrale componenten van autofagie het infectieresultaat beïnvloedt, maar dat ook manipulatie van de synthese van precursors, zoals PtdIns, een vergelijkbaar effect kan hebben. Het begrijpen van PIKfyve-gemedieerd vesikeltransport is daarom van groot belang voor inzicht in het verloop van verschillende infecties.

Naast autofagie draagt LC3-geassocieerde fagocytose (LAP) bij aan de immuunrespons tegen mycobacteriële infectie in macrofagen. Terwijl autofagie intracellulaire bacteriën aanvalt die het cytosol binnendringen of aanwezig zijn in beschadigde vesikels, wordt LAP geactiveerd door extracellulaire pathogenen die aan oppervlaktereceptoren binden. Hierdoor wordt het fagosoommembraan voorzien van LC3. LAP fungeert als brug tussen fagocytose en de autofagiemachinerie, waarmee lysosomaal transport en afbraak van pathogenen wordt bevorderd. De moleculaire mechanismen waarmee LAP de immuunrespons beïnvloedt, zijn nog slecht begrepen. **In Hoofdstuk 5** wordt de rol van *Rubcn* bij mycobacteriële infectie behandeld. *Rubcn* remt autofagie en stimuleert LAP. Omdat virulentiefactoren van mycobacteriën zowel autofagie als LAP beïnvloeden, is het nog onduidelijk hoe effectief deze twee routes zijn als afweermechanismen. Door *rubcn*-transcriptniveaus te manipuleren via knockdown en mRNA-overexpressie, en een CRISPR-Cas9-zebra-vis-mutantlijn te genereren, konden we de rol van *Rubcn* bestuderen. Afwezigheid van *Rubcn* resulteerde in hogere infectieniveaus bij zowel systemische als gelokaliseerde infecties, terwijl *rubcn*-overexpressie het infectieniveau verminderde. Bovendien was de associatie van LC3 met *Mm*-bevattende vesikels verminderd in *Rubcn*-deficiënte larven. Onze resultaten suggereren dat de afweer tegen *Mm* *Rubcn*-afhankelijk is, wat wijst op een belangrijke rol in de LAP-route. *Rubcn*-deficiëntie verminderde ook het volume van *Mm*-Rab5-associatie, vooral in sterk geïnfecteerde cellen. Omdat Rab5 het transport van vroege endosomen en fagosomen reguleert, suggereert

dit dat Rubcn-deficiëntie de rijping van *Mm*-bevattende fagosomen beïnvloedt, wat de overleving en replicatie van *Mm* bevordert. Concluderend laten de resultaten zien dat verstoring van Rubcn *Mm*-vesikeltransport beïnvloedt en de afweer verzwakt. Hoewel verder onderzoek nodig is om te bevestigen dat LAP actief is tegen *Mm*-infectie in zebravislarven, heeft ons model bewijs geleverd voor de beschermende rol van Rubcn tijdens de vroege stadia van *Mm*-infectie.

Samengevat maakt dit proefschrift gebruik van het zebravis-*Mm*-model om het begrip van de rol van de autofagiemachinerie tijdens vroege mycobacteriële pathogenese in een levende gastheer te vergroten. Met 3D-beeldanalysemethoden werden interacties tussen de pathogeen en het gastheermolecuul LC3, een marker voor vesikels afkomstig van autofagie of LAP, gekwantificeerd. Door deze analyses te combineren met chemische en genetische modulatie, werden nieuwe functies van PIKfyve en Rubcn geïdentificeerd en hun noodzaak voor gastheerresistentie tegen mycobacteriële infectie aangetoond. PIKfyve, een lipidekinase dat de fosfolipidecompositie van membranen moduleert, bevordert de rijping van *Mm*-bevattende vesikels in autofagieroute, wat noodzakelijk is voor lysosomale fusie en bacteriële afbraak. Rubcn heeft een vergelijkbare beschermende functie en bevordert waarschijnlijk de rijping van *Mm*-bevattende fagosomen als activator van LAP. Deze resultaten suggereren dat farmacologische stimulatie van PIKfyve- of Rubcn-activiteiten overwogen kan worden bij de ontwikkeling van gastheergerichte therapieën tegen mycobacteriële infecties.