



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The unexplored functions of Toll-like receptor signaling: immunometabolism, development and microbiome interactions**

Liu, L.

### **Citation**

Liu, L. (2026, March 17). *The unexplored functions of Toll-like receptor signaling: immunometabolism, development and microbiome interactions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4297285>

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/1887/4297285>

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



## **Appendices**

## Nederlandse samenvatting

### 1. De verschillende rollen van TLR2, TIRAP en MyD88 in het basaal metabolisme

De aangeboren immuniteit van de gastheer vormt de eerste verdedigingslinie tegen binnendringende pathogenen en zorgt voor een snelle en brede herkenning van geconserveerde microbiële structuren voordat adaptieve immunoreacties op gang komen. Centraal in dit systeem staan evolutionair geconserveerde patroonherkenningsreceptoren (PRRs), die pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs) detecteren die afkomstig zijn van binnendringende pathogenen en gastheer-afgeleide schade-geassocieerde moleculaire patronen (DAMPs) die vrijkomen uit beschadigde cellen. Een van de best gekarakteriseerde PRRs zijn Toll-like receptoren (TLRs), een familie van type I transmembraaneiwitten die evolutionair geconserveerd zijn van ongewervelde dieren tot gewervelde dieren. Bij het herkennen van PAMPs en DAMPs binden TLRs zich aan specifieke adaptoreiwitten om downstream signaalcascades te activeren. Het Toll-interleukine-1-receptor (TIR)-domein bevattende adapter-eiwit (TIRAP), ook bekend als MyD88-geassocieerd ligand (MAL), functioneert als een adapter-eiwit van TLR2 of TLR4. Als een belangrijke intracellulaire signaaltransductor interageert TIRAP met het TIR-domein van TLR2 en rekruteert vervolgens MyD88. In **hoofdstuk 1** hebben we de voortgang van het onderzoek naar TLR2, TIRAP en MyD88 samengevat.

In **hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat TLR2 een regulator is van het energiemetabolisme van gewervelde dieren onder ongestoorde ontwikkelingsomstandigheden. Met behulp van transcriptomische en metabolomische profilering bij zebrafishlarven hebben we aangetoond dat een gebrek aan TLR2 leidt tot verhoogde glucose-, lactaat-, succinaat- en malaatgehaltenes, gepaard gaande met onderdrukking van de transcriptie van belangrijke glycolytische en gluconeogene enzymen, waaronder *gpib*, *pfkfa*, *pgk1*, *pgam2* en *pck2*. Deze veranderingen wijzen erop dat TLR2 de glucosehomeostase in stand houdt door middel van transcriptieregulatie van metabole routes. Naast het glucosemetabolisme wijzen veranderingen in de hoeveelheid aminozuren op bredere gevolgen voor de metabole regulatie. Belangrijk is dat deze studie het eerste bewijs levert dat TLR2 het metabolisme beïnvloedt bij afwezigheid van infectie, waarmee het eerder onderzoek, dat zich voornamelijk richtte op immunometabole interacties tijdens ziekte of blootstelling aan pathogenen, wordt uitgebreid [1, 2]. De mechanistische basis voor TLR2-activering onder basale omstandigheden blijft

onopgelost, maar kan signalen uit het microbioom omvatten [3]. Deze mogelijkheid wordt ondersteund door steeds meer bewijs dat microbiële metabolieten het immunometabolisme van de gastheer beïnvloeden en door eerdere bevindingen dat TLR2 de door microbiota onderdrukte transcriptie van *myd88* reguleert [4].

In **hoofdstuk 3** wordt de rol van TLR-signalering in het metabolisme verder onderzocht door de verschillende bijdragen van de adapterproteïnen TIRAP en MyD88 te vergelijken. Deze vergelijking laat zien dat TLR2, TIRAP en MyD88 gespecialiseerde functies hebben in het metabolisme van de gastheer onder ongestoorde omstandigheden. Metabolische profilering toont aan dat de *tirap*-mutatie leidt tot verlaagde glucosespiegels, in tegenstelling tot de *tlr2*-mutante larven, die verhoogde glucosespiegels vertonen. Ter vergelijking: de *myd88*-mutante larven vertoonden een smaller metabolisch profiel, met slechts bescheiden transcriptieveranderingen in metabolisme-gerelateerde routes en geen detecteerbare verschillen in glucosespiegels.

Samen laten deze resultaten zien hoe complex de rol van TLR-signalering is bij het regelen van de basale metabolische homeostase. Ze suggereren ook dat als TLR2, TIRAP en MyD88 er niet zijn, dit via verschillende mechanismen zowel de transcriptieprogramma's van de gastheer als de metaboliëtoprofielen verstoort. Deze inzichten vormen de basis voor de volgende hoofdstukken, waarin wordt onderzocht hoe TLR-signalering processen coördineert tijdens weefselbeschadiging, mycobacteriële infecties en interacties met het microbioom.

## **2. De verschillende rollen van TLR2, TIRAP en MyD88 in ontsteking**

Een belangrijk thema dat uit dit proefschrift naar voren komt, is dat metabole regulatie door TLR-signalering mogelijk invloed heeft op het gedrag van immuuncellen. In **hoofdstukken 2** en **3** hebben we aangetoond dat TLR2 en zijn adapter TIRAP een duidelijke invloed hebben op het glucosemetabolisme. Deze metabolische veranderingen kunnen directe of indirecte gevolgen hebben voor de functie van immuuncellen bij ontstekingsreacties tijdens weefselbeschadiging. Immuuncellen zoals neutrofielen en macrofagen zijn afhankelijk van snelle metabolische herstructurering, bijvoorbeeld glycolyse, om migratie, fagocytose en effectorfuncties van brandstof te voorzien [5-7]. In wondtesten in de zebra vis staartvin belemmerden TLR2- en MyD88-deficiëntie de rekrutering van leukocyten naar de wonden [8]. TLR2-deficiëntie leidde ook tot verhoogde vrije glucosespiegels, wat zou kunnen leiden tot verminderde metabolische ondersteuning voor celmotiliteit (**hoofdstuk 2**). Daarentegen

leidde een tekort aan TIRAP tot een versnelde migratie van neutrofielen bij verwondingen aan de staartvin. Dit hangt samen met een verlaagd vrij glucosegehalte en veranderingen in de transcriptieregulatie van glycolyse die verschillen van de veranderingen bij een *tlr2*-mutant (**hoofdstuk 3**). Daarom zou een tegengesteld effect in het migratievermogen van neutrofielen in de *tirap*- en *tlr2*-mutante larven verklaard kunnen worden door verschillen in hun functies in de metabole regulatie. Het verschil in het effect van mutatie van *tlr2* en *tirap* kan op verschillende manieren worden verklaard: (i) bij afwezigheid van TLR2 kan een andere TLR-receptor het functieverlies compenseren; (ii) hoewel TIRAP de enige adapter is waarvan bekend is dat deze zich aan TLR2 koppelt, is het niet onmogelijk dat andere adapters, zoals TRAM, ook het functieverlies van TIRAP kunnen compenseren, wat tot zeer verschillende signaaleffecten kan leiden. Onze bevindingen suggereren dat de adaptor-specifieke regulering van het metabolisme door TLR-signalering gekoppeld is aan de migratiedynamiek van leukocyten, waardoor een mechanistische brug wordt geslagen tussen immunometabolisme en ontsteking. Deze integratieve visie positioneert de TLR2-signaleringsas als een belangrijke regulator van zowel de cellulaire energietoestand als de motiliteit van immuuncellen.

Naast het perspectief van metabole regulatie, suggereren onze transcriptomische en metabolomische studies in **hoofdstuk 3** verschillende mogelijke verklaringen voor waarom de *tirap*-mutant een leukocytengedrag vertoont dat duidelijk verschilt van het gedrag van de *myd88*- en *tlr2*-mutanten in reactie op weefselbeschadiging. Ten eerste werd van de drie onderzochte mutanten alleen *tirap*-deficiëntie in verband gebracht met een brede neerwaartse regulatie van ribosomale-eiwittranscripten, wat wijst op een ribosomale stress reactie. Gezien de vastgestelde rol van ribosomale eiwitten zoals L13a in de translationele regulering van ontstekingsmediatoren [9-12], wijzen deze bevindingen op een verband tussen TIRAP-signalering, ribosomale eiwitexpressie en de regulering van ontstekingsreacties.

Bovendien wijzen specifieke veranderingen in de expressie van calciumkanaal- en myosine-gerelateerde genen op een rol voor TIRAP in de calciumafhankelijke regulering van het cytoskelet. Onze transcriptomische analyse toonde een opregulatie van calciumkanalen en myosine-gerelateerde genexpressie aan, specifiek in de *tirap*-mutant. Calciumionen fungeren als cruciale tweede boodschappers die actine-myosine-interacties activeren, niet alleen in spiercellen, maar ook in diverse andere celtypen [13-15]. Myosineactiviteit is een cruciaal onderdeel van afweerreacties in myeloïde cellen [16]. Met name is aangetoond dat reactieve

zuurstofspecies (ROS) de *CACNAIS*-expressie negatief reguleren in de context van *Mycobacterium tuberculosis*-infectie [17]. Daarnaast zijn reactieve zuurstof radicalen (ROS) ook belangrijke modulators van celmigratie tijdens weefselbeschadiging [18]. Daarom kan de gewijzigde expressie van *cacna1a* in de *tirap*-mutant mechanistisch relevant zijn voor de effecten ervan op de migratie van neutrofielen. Samen genomen suggereren deze bevindingen dat TIRAP bijdraagt aan de regulering van de calciumafhankelijke myosinefunctie, wat ten grondslag zou kunnen liggen aan de verhoogde snelheid van neutrofielenmigratie die wordt waargenomen in de *tirap*-mutant na verwonding.

Een andere verklaring voor de duidelijke effecten van *tirap*-deficiëntie op celmigratie, in vergelijking met *myd88*- en *tlr2*-mutanten, is de differentiële invloed ervan op de regulering van cytokines en chemokines. De *tirap*-mutant vertoonde op unieke wijze een neerwaartse regulatie van *cxcl12a*, een chemokine met een welbekende rol in de reactie van neutrofielen op ontstekingen. In overeenstemming hiermee hebben eerdere studies aangetoond dat *cxcl12a*-mutanten een verhoogde rekrutering van neutrofielen naar wonden bij zebravislarven vertonen [19]. Daarom kan de verhoogde accumulatie van neutrofielen die bij *tirap*-mutanten wordt waargenomen, ten minste gedeeltelijk worden toegeschreven aan een verminderde expressie van *cxcl12a*. Het ontbreken van een effect op de migratie van macrofagen in *tirap*-mutanten, in tegenstelling tot in *tlr2*- en *myd88*-mutanten, blijft echter onverklaard. Om deze leemte op te vullen zijn nieuwe benaderingen nodig, zoals single-cell transcriptomics en lijn-specifieke functionele studies, om de celtypespecifieke rollen van Tirap in neutrofielen, macrofagen en mogelijk T-cellen te ontrafelen.

### **3. TLR2 reguleert de microbiële diversiteit in de darmen van larvale en volwassen zebravis**

Om de rol van TLR2 buiten het immuunsysteem verder te onderzoeken en de interactie tussen TLR2 en het microbioom te begrijpen, hebben we in **hoofdstuk 4** de invloed van TLR2 op de samenstelling van de darmflora tijdens verschillende ontwikkelingsstadia van de zebravis bestudeerd. Onze gegevens tonen aan dat *tlr2*-mutanten bij larven vijf dagen na bevruchting een grotere microbiële diversiteit en een verrijking van geslachten zoals *Chryseobacterium* en *Flectobacillus* vertoonden. Functionele voorspellingen brachten onderdrukking van glycolyseroutes in de microbiota van *tlr2*-mutanten aan het licht, parallel

aan verminderde glycolytische genexpressie bij de gastheer (**hoofdstuk 2**) en benadrukten de bidirectionele metabolische interactie tussen gastheer en microbioom.

Bij volwassenen was de trend omgekeerd. Wilde zebravissen behielden een grotere microbiële diversiteit, met een verrijking van geslachten zoals *Plesiomonas* en *Romboutsia*, terwijl *Cetobacterium* domineerde bij *tlr2*-mutanten. Ook de functionele routes verschilden: glycolyse en de TCA-cyclus waren verrijkt in wilde types, terwijl glycaanbiosynthese en pentosefosfaatroutes verhoogd waren in mutanten. Deze resultaten tonen de dynamische en faseafhankelijke invloed van TLR2 op microbiële diversiteit en metabolisch potentieel aan.

Gezien het verband tussen dysbiose, barrièredisfunctie en inflammatoire darmziekten, waaronder de ziekte van Crohn [20], wijzen onze bevindingen op TLR2 als een potentieel therapeutisch doelwit voor veel darmziekten. Het moduleren van TLR2-signalering of het benutten van TLR2-microbiominteracties kan nieuwe mogelijkheden bieden om het immuunevenwicht in de darmen te herstellen en de uitkomst van ziekten te verbeteren.

#### **4. De rol van TLR2 en het microbioom bij mycobacteriële darminfecties**

##### **4.1 TLR2 en het microbioom moduleren de lokalisatie en verspreiding van mycobacteriën en de transcriptieresponsen tijdens darminfecties.**

In **hoofdstuk 5** breiden we ons onderzoek naar de rol van TLR-signalering uit van metabolisme en ontsteking naar de context van de effecten van interacties tussen gastheer en microbioom op het proces van darminfectie en verspreiding door niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM). Met behulp van zebravissen als *in vivo* model voor gastro-intestinale infecties met *Mycobacterium avium* en *M. marinum* hebben we aangetoond dat TLR2 een centrale rol speelt bij het reguleren van de lokalisatie en verspreiding van mycobacteriën. Immersie-infectietesten toonden aan dat *M. avium* en *M. marinum* opvallend verschillende kolonisatiepatronen vertonen in de darmen van zebravissen, waarbij *M. avium* zich bij voorkeur in de achterste deel van de darm lokaliseert en *M. marinum* in het voorste deel bij wildtype, met micro-organismen gekoloniseerde larven. Deze soortspecifieke patronen werden verdwenen in *tlr2*-mutanten of onder kiemvrije omstandigheden, wat de cruciale rol van zowel TLR2-signalering als microbiom-afgeleide signalen bij het bepalen van de ruimtelijke verspreiding van NTM benadrukt. Gezien de klinische relevantie van *M. avium* als darmpathogeen, onderstrepen deze observaties de noodzaak om de moleculaire

determinanten van lokalisatie te verduidelijken, waarbij waarschijnlijk complexe interacties tussen gastheer en pathoog via de TLR2-route een rol spelen [4]. Op het niveau van genexpressie in het hele organisme toonden qRT-PCR-analyses duidelijke reacties van de gastheer op *M. avium* en *M. marinum* aan, met verschillen die afhankelijk waren van de status van het microbiom. Interessant genoeg vertoonden markers zoals *fos11a* en *cebpb*, die stroomafwaarts van TLR2 liggen, uiteenlopende expressieprofielen, wat suggereert dat aanvullende routes en mediators bijdragen aan soort-specifieke reacties van de gastheer [4]. Mogelijke kandidaten hiervoor zijn andere leden van de TLR-familie en factoren afkomstig van de gastheer uit de darmslijmvliesomgeving, zoals uromoduline, glycoproteïne 2 (GP2) en omcins, die betrokken zijn bij interacties tussen gastheer en microbiom bij zebrafissen en die in zoogdiersystemen geconserveerd zijn [4]. Deze resultaten wijzen op een meerlagig regulerend netwerk waarin TLR2 microbiële signalen integreert met mucosale factoren en signalen afkomstig van het microbiom om het resultaat van mycobacteriële infecties in de darmen te coördineren.

#### **4.2. Macrofagen dragen bij aan de fagocytose en verspreiding van mycobacteriën naar distale weefsels tijdens darminfecties.**

Onze studie in **hoofdstuk 5** toont aan dat na immersie-infectietesten met *M. avium* en *M. marinum*, bacteriën niet beperkt blijven tot de darmen, maar ook voorkomen in perifere weefsels, waaronder de staart. Door de kop in agarose te bedekken en zo de orale toegang te blokkeren, werd bevestigd dat bacteriën niet via intacte huid kunnen binnendringen. We toonden ook aan dat kolonisatie van de kieuwen zeldzaam was, wat het belang van de gastro-intestinale route voor het binnendringen van bacteriën bevestigt. Deze bevinding komt overeen met eerdere rapporten dat huidziekten veroorzaakt door mycobacteriële huidinfecties meestal het gevolg zijn van hematogene verspreiding of verspreiding vanuit onderliggende wondhaarden [21]. Bovendien hebben micro-injectie-experimenten in de darmen duidelijk aangetoond dat de darmen een efficiënte primaire plaats van binnenkomst zijn, van waaruit mycobacteriën zich kort na infectie systemisch verspreiden. Hoe mycobacteriën zich vanuit de darmen verspreiden, met name naar distale weefsels, blijft een belangrijke vraag voor het begrijpen van hun pathogenese. Live-imaging toonde aan dat bacteriën die in distale weefsels werden gedetecteerd, bijna uitsluitend in macrofagen voorkwamen, wat de opvatting ondersteunt dat deze cellen dienen als belangrijkste dragers voor de verspreiding van

pathogenen. Dit komt overeen met eerdere studies bij muizen en zebravissen, waaruit blijkt dat macrofagen mycobacteriën op slijmvliesoppervlakken kunnen fagocyteren en via de bloedsomloop naar distale weefsels kunnen transporteren [22]. Onze macrofaagablatie-experimenten bevestigden onze bevindingen verder, aangezien de verspreiding vrijwel volledig werd tegengegaan bij afwezigheid van macrofagen.

Eerdere studies hebben aangetoond dat *M. tuberculosis* en *M. marinum* bij voorkeur permissieve macrofagen rekruteren en infecteren, terwijl ze microbicidale subgroepen ontwijken. Een strategie van de gastheer om deze immunontwijking tegen te gaan is de TLR2-afhankelijke rekrutering van microbicidale macrofagen [22]. In overeenstemming hiermee tonen onze resultaten aan dat TLR2-deficiëntie het aantal macrofagen dat *M. avium* en *M. marinum* herbergt aanzienlijk vermindert, wat het belang van TLR2 bij het reguleren van de macrofaagfunctie tijdens mycobacteriële infecties onderstreept. Om dit mechanisme verder te onderzoeken, moeten toekomstige studies zich richten op het onderscheiden van permissieve en microbicidale macrofagen *in vivo* tijdens darminfecties. Geavanceerde benaderingen zoals single-cell transcriptomics en ultrastructurele elektronenmicroscopie zullen bijzonder waardevol zijn voor het oplossen van de heterogeniteit van macrofagen en voor het blootleggen van hoe TLR2 de interacties tussen gastheer en ziekteverwekker binnen de micro-omgeving van de darm vormgeeft.

### **4.3. Gedrag van macrofagen en interacties tussen TLR2 en het microbiom tijdens mycobacteriële darminfecties**

In **hoofdstuk 5** laten we zien dat TLR2 een cruciale rol speelt bij het reguleren van de rekrutering en beweeglijkheid van macrofagen tijdens een mycobacteriële infectie van de darmen. Door middel van micro-injectie van *M. avium* en *M. marinum* in de darmen hebben we waargenomen dat *tlr2*-mutanten een verminderde accumulatie van macrofagen op infectieplaatsen en een verminderde migratiesnelheid vertoonden. Deze bevindingen komen overeen met eerdere infectiemodellen bij zebravissen en breiden de rol van TLR2 uit naar natuurlijke darminfecties [23]. Bovendien waren er ook duidelijk migratiestoornissen bij macrofagen na PBS-injectie bij *tlr2*-mutanten, wat wijst op een bredere rol voor TLR2 bij wondreacties en overeenkomt met bevindingen uit eerdere experimenten met verwonding van de staartvin van zebravis larven [8]. Opvallend was dat dit effect afhankelijk was van de kolonisatie door het microbiom. Wilde-type larven onder geconventionaliseerde

omstandigheden vertoonden een verbeterde motiliteit van macrofagen in vergelijking met kiemvrije larven, terwijl deze microbioomafhankelijke modulatie afwezig was bij de *tlr2*-mutanten. Deze resultaten suggereren dat TLR2-signalering nodig is voor de door het microbioom gemedieerde modulatie van de dynamiek van aangeboren immuuncellen op systeem niveau. Analoge studies hebben aangetoond dat *M. tuberculosis* infecties veroorzaakt in de relatief steriele onderste luchtwegen, in plaats van in de microbenrijke bovenste luchtwegen, waar signalen afkomstig van de microbiota de rekrutering van microbicidale macrofagen bevorderen via TLR-afhankelijke routes [24]. Onze bevindingen ondersteunen dit perspectief en breiden het uit naar de darmcontext, waarbij een mogelijk mechanisme wordt benadrukt waarmee het microbioom, via TLR2-signalering, het gedrag van macrofagen moduleert en de reacties van de gastheer op mycobacteriële infecties beïnvloedt. Om de transcriptiereacties verder te onderzoeken, hebben we het *mmp9*-gen geanalyseerd, een marker die verband houdt met de vorming van granulomen tijdens een infectie met *M. marinum* [25]. De inductie van *mmp9* was gedeeltelijk afhankelijk van TLR2, wat suggereert dat macrofagen mogelijk worden gerekruteerd naar epitheelplaatsen in de darmen via TLR2-afhankelijke MMP9-secretie, mogelijk in interactie met andere TLR's zoals TLR8 [3, 25]. Toekomstige studies waarbij gebruik wordt gemaakt van single-cell transcriptomics en opkomende *in situ* bacteriële transcriptoombenaderingen zullen van cruciaal belang zijn om de complexe wisselwerking tussen gastheer-macrofagen, binnendringende mycobacteriën en de TLR2-microbiom-as te ontrafelen [20].

## **5. Aanvullende gegevens over de functie van TLR2: De afwezigheid van TLR2 en het microbiom bevorderen de proliferatie van mycobacteriën na systemische infectie.**

Naast orale darminfecties hebben we ook de bijdrage van TLR2 en het microbiom aan de systemische afweer van het lichaam onderzocht door middel van systemische injectie van niet-tuberculeuze mycobacteriën via het “Duct of Cuvier”. Deze analyses zijn niet opgenomen in dit proefschrift, maar de voorlopige resultaten zijn wel relevant voor de discussie. Deze aanpak omzeilt de darmbarrière en stelt circulerende immuuncellen rechtstreeks bloot aan de infecties. Door middel van micro-injectie van *M. avium* en *M. marinum* in het Duct of Cuvier hebben we waargenomen dat *tlr2*-mutanten een hogere bacteriële een hogere bacteriële belasting met *M. marinum* vertoonden in vergelijking met het wildtype, wat overeenkomt met bevindingen uit eerder onderzoek naar infectie van de

staartader van zebravissen door middel van injectie in het bloedvat [26]. Bovendien vertoonden zowel *tlr2*-mutanten als kiemvrije larven, in overeenstemming met onze gegevens over darminfecties, een verhoogde bacteriële belasting na systemische injectie met *M. avium*-stam MAC 101 en *M. marinum*-stam Mma20, wat de beschermende rol van TLR2 en het microbioom bij het beperken van de groei van mycobacteriën onderstreept (Figuur 1 en 2). Deze bevindingen wijzen erop dat TLR2-afhankelijke signalering een geconserveerd afweermechanisme biedt dat verschillende infectieroutes geldt voor, terwijl het microbioom de systemische weerstand versterkt door de aangeboren immuunrespons te moduleren. Samen vormen deze resultaten een aanvulling op ons darminfectiemodel en benadrukken ze de brede beschermende functies van de TLR2-microbiom-as bij het beheersen van mycobacteriële pathogenese.

## **6. Potentiële translationele rol van TLR2 en het microbiom bij mycobacteriële darmaandoeningen**

Onze resultaten tonen aan dat TLR2 een cruciale regulator is van de macrofaagfunctie tijdens intestinale mycobacteriële infecties. In zebravissen leidde een tekort aan TLR2 tot verminderde fagocytose en migratie van macrofagen, wat resulteerde in een verhoogde bacteriële belasting, in overeenstemming met de beschermende rol die reeds is beschreven in modellen voor longinfecties [27-30]. Deze bevindingen ondersteunen de bredere visie op TLR2 als potentieel therapeutisch doelwit voor mycobacteriële aandoeningen, waarbij het meeste eerdere onderzoek zich richtte op de longen. Verder tonen wij aan dat het microbiom een sterke invloed uitoefent op de uitkomst van een mycobacteriële infectie in de darmen. Kiemvrije larven vertoonden een verhoogde bacteriële kolonisatie, verminderde macrofaagmotiliteit en veranderde transcriptiereacties van de gastheer in vergelijking met geconventionaliseerde larven, effecten die afhankelijk waren van TLR2-signalering. Dit wijst op een TLR2-microbiom-as die de immuunafweer in de darm reguleert, waarmee eerdere gnotobiotische zebravisstudies worden uitgebreid die TLR2 in verband brachten met systemische ontstekingscontrole bij afwezigheid van pathogenen [4]. De klinische relevantie van deze bevindingen wordt ondersteund door parallellen met de ziekte van Johne bij herkauwers en de ziekte van Crohn bij mensen [31, 32]. TLR2-polymorfismen worden in verband gebracht met vatbaarheid voor de ziekte van Johne, terwijl de ziekte van Crohn wordt gekenmerkt door TLR2-ontregeling, een verstoorde microbiële balans en chronische

ontstekingen [33-36]. Ons zebra-vis-model biedt een krachtig platform om deze verbanden te onttrafen, met hoge doorvoer-infectie experimenten, beeldvorming van levende organismen en genetische manipulatie. Belangrijk is de observatie dat de chemische TLR2-remmer C29 *tlr2*-mutanten fenokopieert. Dit onderstreept het potentieel van chemische screening in dit systeem om therapeutische strategieën te identificeren die de vroege verspreiding van mycobacteriën in de darmen beperken.

## **7. Naar een toekomstig begrip van TLR2-sigtaaltransductie**

Het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, identificeert TLR2 als een centrale regulator op het kruispunt van metabolisme, ontsteking, microbiële interacties en infectie. Ondanks aanzienlijke vooruitgang blijven veel mechanistische vragen onbeantwoord. De volgende paragrafen schetsen mogelijke richtingen voor toekomstig onderzoek die het huidige begrip van TLR2-gemedieerde immuun- en metabole regulatie verder kunnen verdiepen.

### **7.1 TLR2-sigtaaltransductie in metabole regulatie**

De mechanismen die TLR2-activering koppelen aan glucose- en lipidenmetabolisme onder basale fysiologische omstandigheden zijn nog onvoldoende opgehelderd. Hoewel onze gegevens metabole veranderingen in *tlr2*-mutanten aantonen, moeten de precieze endogene of door de microbiota afgeleide liganden die TLR2 activeren en het gastheer-metabolisme beïnvloeden nog worden geïdentificeerd.

Toekomstig onderzoek zou zich kunnen richten op gerichte metaboliëtoprofilering en integratie van metabolomische en transcriptomische analyses om dergelijke liganden en signaalintermediëren te identificeren. Daarnaast kan het combineren van metabole fluxanalyse met single-cell transcriptomics inzicht geven in hoe TLR2 celtype-specifieke metabole programma's aanstuurt en het systemische energiemetabolisme coördineert. Deze benadering zal helpen te bepalen of TLR2 primair functioneert als een metabole sensor of als een downstream-effector binnen het immuun-metabole netwerk.

## **7.2 Adaptor-specifieke regulatie van ontsteking**

Onze resultaten tonen aan dat TIRAP- en MyD88-afhankelijke signaalroutes van TLR2 leiden tot verschillende transcriptionele, metabole en inflammatoire uitkomsten. Deze adaptorspecificiteit roept belangrijke vragen op over hoe verschillende downstream-pathways de aard en intensiteit van ontstekingsreacties bepalen.

Toekomstig onderzoek zou gebruik moeten maken van high-resolution multi-omics, waaronder single-cell RNA-sequencing, proteomics en ruimtelijke beeldvorming, om de celtype- en weefselspecifieke bijdragen van deze adaptoren in vivo te ontrafelen. Bijzondere aandacht verdient de ribosomale stress- en calciumafhankelijke signaalactiviteit die werd waargenomen bij TIRAP-deficiëntie, aangezien deze mogelijk een niet-conventionele immuunregulerende as vertegenwoordigt die stressreacties koppelt aan ontstekingsprocessen.

## **7.3 TLR2 en de microbiome-interface**

Het in dit proefschrift ontwikkelde zebravismodel biedt een krachtig systeem om te onderzoeken hoe TLR2 de symbiose tussen gastheer en microbiota vormgeeft. Toekomstige studies zouden zich niet alleen moeten richten op mono-associatie-experimenten, maar ook op complexe microbiële gemeenschappen door gebruik te maken van gnotobiotische recolonisatie en gedefinieerde bacteriële consortia.

Door single-cell transcriptomics van de gastheer te combineren met bacteriële metatranscriptomics kan men een ruimtelijk gedetailleerd beeld krijgen van de communicatie tussen gastheer en microbiota aan de mucosale barrière. Dergelijke benaderingen kunnen helpen om specifieke bacteriesoorten, metabolieten of herkenningspatronen te identificeren die tolerantie of ontsteking sturen via TLR2-afhankelijke mechanismen.

## **7.4 TLR2 bij mycobacteriële infectie en translationele relevantie**

Onze zebra-infectiemodellen tonen aan dat de TLR2-microbioom-as de verspreiding en immuuncontrole van mycobacteriële darminfecties beïnvloedt. Het uitbreiden van deze bevindingen naar verschillende Mycobacterium-soorten, en naar co-infecties of microbiota-verstoringen door antibiotica, zal helpen om de algemene geldigheid van deze mechanismen te verduidelijken.

Vanuit een translationeel perspectief vormen TLR2 en zijn adaptor-netwerk veelbelovende therapeutische doelwitten voor niet-tuberculeuze mycobacteriële infecties en ontstekingsziekten van de darm. Toekomstig onderzoek dat genetische modulatie van de gastheer combineert met microbiom-gebaseerde interventies, zoals probiotische consortia of metaboliet-suppletie, zou kunnen leiden tot precisie-immunometabole therapieën die de mucosale homeostase herstellen zonder de antimicrobiële afweer te verzwakken.

Over het algemeen moet de translationele relevantie van TLR2-signalering verder worden onderzocht in zoogdiermodellen en menselijke systemen. De parallellen tussen onze bevindingen bij zebravissen en pathologische processen bij de ziekte van Johne en de ziekte van Crohn suggereren dat TLR2-modulatie kan worden ingezet voor therapeutische doeleinden. Het zou zeer interessant zijn om de functie van TLR2 bij het metabool vermageringsyndroom (cachexie) verder te onderzoeken, een veelvoorkomend kenmerk van de ziekte van Johne, de ziekte van Crohn en tuberculose. Dit zou ook ons begrip van de functie van TLR-signalering bij het wasting syndrome in late stadia van kanker kunnen verbeteren. Chemische screening bij zebravissen, zoals aangetoond door het gebruik van de TLR2-remmer C29, zou een pijlpijn kunnen bieden voor het identificeren van nieuwe, op de gastheer gerichte therapieën tegen stofwisselingsstoornissen, chronische ontstekingen en mycobacteriële infecties. Toekomstig onderzoek moet gericht zijn op het integreren van moleculaire, cellulaire en ecologische perspectieven om een begrip op systeemniveau van TLR2-signalering op te bouwen. Dergelijke integratieve benaderingen zullen niet alleen onze kennis van de fysiologie van de gastheer verdiepen, maar ook de ontwikkeling bevorderen van gerichte therapieën die gebruikmaken van de TLR2-microbiom-metabolisme-as om de menselijke gezondheid te verbeteren.

## **8. Slotopmerkingen**

Het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, bevestigt dat TLR2 een centrale rol speelt in de fysiologie van gewervelde dieren, door metabolische regulatie, ontstekingssignalering, infectiebeheersing en interacties tussen gastheer en microbiom met elkaar te verbinden. We tonen aan dat TLR2 en zijn adapterproteïne TIRAP de glucosehomeostase in stand houden onder normale omstandigheden, de metabole toestand koppelen aan de migratie van leukocyten tijdens wondgenezing, en dat TLR2 in het bijzonder het gedrag van macrofagen en de verspreidingsdynamiek reguleert tijdens niet-tuberculeuze

mycobacteriële infecties. TLR2 gaat verder dan immuniteit en bepaalt ook de diversiteit en het functionele potentieel van het darmmicrobioom in verschillende ontwikkelingsstadia, wat zijn rol als moleculaire interface tussen het metabolisme van de gastheer, microbiële gemeenschappen en immuunafweer benadrukt.

Door microbiële detectie te integreren met metabole regulatie, leukocytdynamica en microbioomcontrole, komt de TLR2-signaleringsas naar voren als een centraal knooppunt in het immunometabolisme van gewervelde dieren. Aan de hand van zebrafismodellen met transcriptomische, metabolomische en gnotobiotische benaderingen toont dit onderzoek aan dat TLR2 zowel immuunreacties als microbiële gemeenschappen moduleert, wat het potentieel ervan als therapeutisch doelwit bij stofwisselingsstoornissen, ontstekingsziekten en mycobacteriële infecties bij mensen onderstreept.