

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

Suikers op mycobacteriën: virulentiefactoren of slechts ter decoratie?

Tuberculose (TB) is nog steeds een van de belangrijkste infectieziekten in de wereld en verantwoordelijk voor jaarlijks 1.7 miljoen doden. TB wordt veroorzaakt door een bacterie: *Mycobacterium tuberculosis*, welke zich makkelijk via de lucht kan verspreiden. De ziekte is over het algemeen goed te behandelen met antibiotica, maar problemen ontstaan wanneer deze antibiotica niet voorhanden zijn of de antibioticakuur niet wordt afgemaakt. De TB-bacillen kunnen dan resistent (ongevoelig) worden tegen de medicijnen; de zogenaamde ‘multidrug-resistent’ (MDR-) en ‘extensively drug-resistant’ (XDR-)TB die moeilijk tot zelfs onmogelijk is te behandelen. Een vaccin tegen TB bestaat, dit is het ‘zwakkere broertje’ van *M. tuberculosis*: *Mycobacterium bovis* BCG. Helaas is het BCG-vaccin niet 100% effectief en levert het niet afdoende bescherming op tegen TB-verspreiding via de luchtwegen bij volwassen mensen. Onderzoek naar de redenen voor deze lage effectiviteit van het BCG-vaccin levert aanwijzingen op voor het kunnen verbeteren van het BCG-vaccin, of voor een heel andere type vaccins die mogelijk wel meer bescherming kunnen bieden.

Hoewel geschat wordt dat ongeveer een derde van de wereldbevolking besmet is met *M. tuberculosis*, wordt slechts 5 tot 10% hiervan daadwerkelijk ziek. In de andere gevallen kan de bacterie overleven in het menselijke lichaam zonder verder symptomen te veroorzaken en zo to een zogeheten ‘latente infectie’ leiden. Bij een verzwakt immuunsysteem kan de bacterie alsnog de ziekte TB veroorzaken. TB eist dan ook veel levens onder mensen in ontwikkelingslanden, vooral in combinatie met AIDS. Een van de redenen dat de TB-bacterie niet altijd volledig uitgeschakeld wordt door het immuunsysteem (de afweerreactie van de gastheer) van geïnfecteerde personen, is dat de bacterie het immuunsysteem kan beïnvloeden en er daardoor deels aan kan ontsnappen. Wel worden de mycobacteriën omringd en ingekapseld door cellen van het immuunsysteem, wat leidt tot het vormen van granuloma’s: de structuren in de longen die met behulp van röntgenfoto’s te zien zijn.

In het onderzoek in dit proefschrift is een factor -een product gemaakt door de mycobacteriën- onderzocht die mogelijk een rol speelt bij het onderdrukken door de mycobacteriën van een effectieve afweerreactie. Het gaat om een onderdeel uit de celwand van mycobacteriën. De mycobacteriële celwand is in vergelijking met die van veel andere soorten bacteriën vrij dik en complex. Een belangrijke component ervan zijn de glycolipiden. Dit zijn structuren samengesteld uit vetten en suikers die nodig zijn voor onder andere de stabiliteit van de celwand van de bacteriën. Eén van die glycolipiden is *lipoarabinomannan* (LAM). LAM is uniek voor mycobacteriën en aanverwante soorten bacteriën. Hoewel de basisstructuur van LAM bij de verschillende soorten mycobacteriën hetzelfde is (**Hoofdstuk 1** Figuur 3 en **Hoofdstuk 2** Figuur 1), is er een verschil te vinden aan de uiteindes van de LAM-structuur. Bij *M. tuberculosis*

&

en *M. bovis* BCG zitten er op het uiteinde van LAM nog 1 tot 3 extra suikers van het type mannose. Deze worden de mannose caps (de 'sugar caps' uit de titel) genoemd en maken LAM van *M. tuberculosis* en *M. bovis* BCG tot mannose-gecapte LAM, afgekort als ManLAM. Eerder onderzoek met opgezuiverd ManLAM, dat wil zeggen geëxtraheerd uit mycobacterie-cellen, heeft al aangetoond dat 1) de mannose cap essentieel is voor herkenning van LAM door specifieke cellen van het immuunsysteem en 2) dat alleen ManLAM, maar niet 'caploos' LAM, vervolgens hierdoor een ontstekingsreactie door deze immuuncellen kan onderdrukken. Vragen die hierop volgden waren: was is de rol van deze mannose caps op LAM bij hele, intacte mycobacteriën en hun interactie met het immuunsysteem? Welke genen zijn betrokken bij het maken van de mannose cap op LAM? En bij welke mycobacterie-soorten naast *M. tuberculosis* en *M. bovis* BCG zijn er ook mannose caps aanwezig, bijvoorbeeld ook bij niet-pathogene soorten?

&

Om de eerste vraag te beantwoorden was een mutant mycobacterie-stam met caploos LAM nodig. Dit houdt dat deze stam hetzelfde is als de oorspronkelijke (wild-type) stam op één punt na doordat één gen is gemuteerd (uitgeschakeld): er zijn géén mannose caps aanwezig op LAM. Hiervoor is wel belangrijk te weten welke gen in de bacterie gemuteerd moet worden. Een screening leverde twee genen op die essentieel waren voor de productie van wel de mannose cap, maar niet voor de productie van LAM zelf (**Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 3**). De functie van het eerste gen, genoemd *capA*, was duidelijk: dit gen is direct nodig voor het plaatsen van de mannose-suikers op LAM (**Hoofdstuk 2**). Het tweede gen heeft een meer indirecte rol en mutatie van dit gen leidde tot meerdere veranderingen in de celwand van de mycobacteriën en het hevig samenklonteren van de bacteriën (**Hoofdstuk 3**). Deze tweede mutant is door de vele verschillen met de wild-type stam lastiger te vergelijken wat betreft specifiek het effect van de aan- of afwezigheid van de mannose cap op LAM. Voor de eerste mutant, $\Delta capA$, kon dit wel. Daarom zijn beide mycobacterie-stammen, *M. bovis* BCG wild-type en *M. bovis* BCG $\Delta capA$, met elkaar vergeleken in een serie van verschillende experimenten.

Eén van de belangrijkste experimenten hierbij waren de 'bindingsstudies'. De immuuncellen die ManLAM herkennen zijn dendritische cellen (DCs). DCs hebben een belangrijke rol in het aansturen van de reactie van het immuunsysteem. De herkenning van ManLAM door DCs verloopt via een receptor, genaamd DC-SIGN, aan de oppervlakte van de DCs. De receptor DC-SIGN kan goed aan de mannose cap van LAM binden, maar níet aan caploos LAM. Daarom zijn de *M. bovis* BCG wild-type stam met ManLAM en de mutant $\Delta capA$ stam met caploos LAM getest voor binding aan DC-SIGN op DCs (**Hoofdstuk 2**). Volgens de hypothese zou DC-SIGN minder goed aan de mutant $\Delta capA$ stam moeten binden dan aan de wild-type stam. Toch bleek geen verschil in binding van beide stammen door DC-SIGN te zijn. Hoewel DC-SIGN wat betreft opgezuiverd LAM dus alleen mannose-gecapped ManLAM herkent, blijkt de aan- of afwezigheid van mannose cap op LAM voor de binding van hele, intacte mycobacteriën aan DC-SIGN geen rol te spelen. Dat DC-SIGN dus ook aan de mutant *M. bovis* BCG stam bindt, betekent dat er aan de buitenkant van de mycobacteriële celwand nog andere structuren aanwezig moeten zijn die ook door

DC-SIGN herkend en gebonden kunnen worden (**Hoofdstuk 2**). Dit kwam ook tot uiting in vervolg-experimenten waarbij zowel de wild-type als de mutant stam een vergelijkbare afweerreactie door DCs opriepen (**Hoofdstuk 2**). De mannose cap bleek geen dominante rol te vervullen in de interactie van mycobacteriën met het immuunsysteem van hun gastheer.

Hoewel de mannose caps geen hoofdrol bleken te spelen in de beïnvloeden van de reactie van het immuunsysteem op de mycobacterie, liet een uitgebreide screening naar de aan- en afwezigheid van mannose caps op LAM van verschillende *Mycobacterium*-soorten wel zien dat er een opvallende verdeling te zien is onder de geteste soorten (**Hoofdstuk 4**). Het genus van *Mycobacterium* is namelijk onder te verdelen in een groep langzaam-groeiende en in een groep snel-groeiende mycobacterie-soorten. De eerste groep, de langzaam-groeiende, bevat *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG en nog ook nog een aantal andere ziekteverwekkende mycobacterie-soorten zoals *Mycobacterium leprae* (veroorzaker van lepra) en *Mycobacterium marinum* (vis-pathogeen en veroorzaker van huidinfecties bij mensen). De groep van snel-groeiende soorten bevat voornamelijk niet-pathogene soorten of soorten die alleen infecties kunnen veroorzaken bij personen met een niet-goed functionerend immuunsysteem. Voor een paar *Mycobacterium*-soorten was al bekend of hun LAM wel of niet gedecoreerd was met mannose caps, maar de kennis hierover werd nu uitgebreid tot in totaal 17 langzaam-groeiende soorten en 19 snel-groeiende soorten (zie voor een overzicht van alle soorten en hun relatie tot elkaar Figuur S1 in de supplementary material van **Hoofdstuk 4**). De langere mannose caps bestaande uit drie mannose-suikers (welke herkend worden door de immuunreceptor DC-SIGN), werden alleen gevonden in de groep van de langzaam-groeiende soorten en wel bij alle geteste soorten daarin. De meeste snel-groeiende soorten bleken geen mannose cap op hun LAM te hebben, al werd er onverwacht een kortere variant bestaande uit één mannose-suiker ontdekt bij enkele snel-groeiende (**Hoofdstuk 4**). Zeer waarschijnlijk heeft deze kortere variant niet dezelfde effecten op het immuunsysteem als de langere mannose cap zoals aanwezig op LAM van *M. tuberculosis*. Eerdere publicaties suggereren dat de groep van langzaam-groeiende mycobacterie-soorten waarschijnlijk vanuit één gezamenlijke voorouder geëvolueerd is en meer recent (later in de evolutie) dan de snel-groeiende groep. De hypothese is daarom nu ook dat de langere mannose cap ook later in de evolutie ontwikkeld is ongeveer tegelijkertijd met de evolutie van de langzaam-groeiende mycobacterie-soorten.

Naast de mannose caps op LAM, zijn er op de oppervlakte van mycobacteriën nog andere structuren te vinden met mannose-suikers erop. Eén daarvan is PIM₆ (voluit: phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannoside). PIM₆ is ook een glycolipide dat sterk lijkt op LAM, maar dan veel kleiner. Wel komt een deel van PIM₆ volledig overeen met de mannose caps op LAM. Omdat de *M. bovis* BCG $\Delta capA$ stam met caploos LAM nog steeds goed door de immuunreceptor DC-SIGN gebonden werd, zou PIM₆ hierin een rol kunnen spelen en dit werd verder uitgezocht (**Hoofdstuk 5**). PIM₆ bleek inderdaad goed door DC-SIGN gebonden te kunnen worden en kan dus in potentie de interactie tussen mycobacteriën en DC-SIGN bepalen. Daarom werd in zowel de *M. bovis*

&

BCG wild-type als de al eerder gemaakte $\Delta capA$ stam, het gen *pimE* uitgeschakeld dat nodig is voor de productie van PIM₆. In de celwand van de dubbelmutant *M. bovis* BCG $\Delta capA\Delta pimE$ stam zijn dus géén mannose caps en géén PIM₆ te vinden. Hoewel nu twee belangrijke celwand-componenten -in de wild-type stam in relatief grote hoeveelheden aanwezig en beide sterk DC-SIGN-bindend- niet meer aanwezig waren, bleek ook deze dubbelmutant stam nog steeds even goed door DC-SIGN en DCs gebonden te worden als de wild-type stam (**Hoofdstuk 5**). Dat betekent dat er aan de buitenkant van mycobacteriën nog andere componenten aanwezig moeten zijn die lijken op de mannose caps en op PIM₆ en ook op dezelfde manier herkend worden door het immuunsysteem.

Omdat het waarschijnlijk niet haalbaar is een mycobacterie-stam te maken die niet of nauwelijks aan DC-SIGN herkend en gebonden wordt (dan moeten er immers meerdere genen uitgeschakeld worden om alle DC-SIGN-liganden te verwijderen, maar niet alle genen en liganden zijn ook bekend) is het vraagstuk ook van een andere kant benaderd. In plaats van componenten te verwijderen, hebben we geprobeerd alle mannose caps en vergelijkbare structuren te bedekken en af te schermen voor DC-SIGN door juist iets toe te voegen aan de mycobacteriën: cyanovirin-N (CV-N). CV-N is een eiwit dat wordt geproduceerd door een heel ander soort bacterie (*Nostoc ellipsosporum*) en daaruit opgezuiverd kan worden. CV-N hecht sterk aan de mannose-suikers en bleek inderdaad deze mannose-suikers ontoegankelijk te maken voor DC-SIGN (**Hoofdstuk 6**). DC-SIGN bond minder goed aan mycobacteriën behandeld met CV-N dan aan de onbehandelde controle-mycobacteriën. Om de rol van de mannose-suikers in de start van een TB-infectie te bestuderen en te testen of CV-N een TB-infectie hierdoor kan remmen of voorkomen, is zowel onbehandelde als CV-N-behandelde *M. tuberculosis* getest in een long-infectie experiment met muizen. De onbehandelde en CV-N-behandelde mycobacteriën bleken een even sterke TB-infectie te veroorzaken (**Hoofdstuk 6**). De conclusie die hieruit getrokken kan worden is, dat ook al worden de mannose-suikers die mogelijk een afweerreactie kunnen onderdrukken, afgeschermd, er geen verschil is in het verloop van de infectie. Ook kan CV-N helaas niet op deze manier bescherming bieden tegen TB.

Concluderend blijken de mannose caps op ManLAM niet één van de belangrijkste virulentiefactoren op *M. tuberculosis* te zijn. Mogelijk beschikken *M. tuberculosis* en andere pathogene mycobacterie-soorten over zoveel strategieën om het immuunsysteem van hun gastheer te omzeilen en te onderdrukken, dat de rol hierin van de mannose cap kleiner is (**Hoofdstuk 8**).

Er is veel gepubliceerd over de mannose caps op LAM, LAM zelf en vergelijkbare glycolipiden, zowel over de productie in de mycobacterie (biosynthese) als over alle mogelijke wisselwerkingen, niet alleen via DC-SIGN, tussen LAM en het immuunsysteem. Dit staat allemaal beschreven in de laatste twee hoofdstukken, **Hoofdstuk 7** en **Hoofdstuk 8**.

