

SAMENVATTING

Virulentie van mycobacteriën - balanceren op een dun koord

Vele millennia lang veroorzaken mycobacteriën infectieziekten in de mens. De meest levensbedreigende van deze ziekten is tuberculose (TB), die wordt veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*. Bij het ontstaan van de moderne mensheid, zo'n 40.000 jaar geleden, was deze pathogeen naar alle waarschijnlijkheid al in staat om mensen te infecteren en heeft een lange periode van co-evolutie geleid tot zijn dodelijke succes. Het huidige BCG vaccin dat wordt gebruikt tegen TB dateert uit 1921 en biedt slechts een variabele bescherming. Juist in die regio's waar de ziekte het grootste probleem is (rond de evenaar), is de mate van bescherming het laagst. Door de efficiënte overdracht en capaciteit van de ziekteverwekker om jarenlang sluimerend in het lichaam aanwezig te blijven zonder te worden afgedood, ingekapseld in de immuuncelstructuur van het granuloom, draagt op dit moment 1/3 van de wereldbevolking *M. tuberculosis* met zich mee. Het merendeel van deze mensen woont in Afrika en Zuid-Oost Azië, hoewel ook in Oost-Europa de laatste jaren een sterke stijging in de incidentie wordt waargenomen. TB is te behandelen door een langdurige kuur met verschillende antibiotica. Omdat deze medicijnen alleen actief delende bacteriën kunnen afdoden, en *M. tuberculosis* in staat is in een toestand te geraken waarbij de bacterie zich niet reliceert, is een minimale duur van 6 maanden antibioticagebruik noodzakelijk om de ziekte effectief te bestrijden. Echter, door verkeerd gebruik van antibiotica, zoals te lage doseringen en het niet afmaken van een kuur, ontstaan er steeds meer antibiotica-resistente stammen. Om te voorkomen dat TB een onbehandelbare ziekte wordt, is het van groot belang om beter werkende vaccins en nieuwe medicatie te ontwikkelen. Hiervoor zijn nieuwe strategieën nodig, waarbij een goed inzicht in de ziekteverwekkende eigenschappen van *M. tuberculosis* essentieel is.

In dit proefschrift is een serie onderzoeken naar de ziekteverwekkende eigenschappen van pathogene mycobacteriën beschreven. Vanwege veiligheidsvoorschriften en het gemak van werken zijn deze studies voornamelijk uitgevoerd met *Mycobacterium marinum*, een bacteriesoort die TB in koudbloedige dieren zoals vissen veroorzaakt. Genetisch gezien staat *M. marinum* zeer dichtbij *M. tuberculosis*, en ook het ziekteverloop dat volgt op een infectie met deze pathogeen vertoont veel gelijkenissen met TB in de mens. Beide soorten mycobacteriën kunnen gebruik maken van gespecialiseerde eiwit-transportsystemen, die erop gericht zijn het lipide-rijke en ondoordringbare celmembraan toegankelijk te maken voor import en export. Deze zogenaamde type VII systemen worden in het DNA gecodeerd door de *esx*-genclusters, waarvan er vijf homologen in het mycobacteriële genoom aanwezig kunnen zijn. Van ESX-1, ESX-3 en ESX-5 is de functionaliteit bewezen; deze systemen zijn in staat bacteriële eiwitten naar het extracellulaire milieu te transporteren. In dit proefschrift wordt dieper ingegaan op de ESX-1 en ESX-5 transportsystemen. Het laatstgenoemde systeem is uitsluitend aanwezig in de langzaam groeiende, voornamelijk pathogene mycobacteriën, wat doet vermoeden dat het een belangrijke rol in de virulentie vervult. Het is bekend dat ESX-5 verantwoordelijk is voor de export van PE en PPE eiwitten, die gekenmerkt worden door een Pro-Glu en

Pro-Pro-Glu aminozuursequentie in de N-terminus. Hoewel de functie van deze eiwitten tot nu toe grotendeels onbekend is, suggereert het feit dat maar liefst 10% van het genomisch coderingspotentieel van pathogene mycobacteriën gewijd is aan het maken van deze eiwitten, dat ze een belangrijke rol spelen in het functioneren van de bacteriën. In **Hoofdstuk 2** is onderzocht welke eiwitten via ESX-5 naar het extracellulaire milieu worden getransporteerd. Door gebruik te maken van een genetische mutant van *M. marinum* waarvan het ESX-5 systeem defect is, kon een groot aantal PE en PPE eiwitten worden aangemerkt als ESX-5-afhankelijk voor uitscheiding. Van de subklasse PE_PGERS binnen de groep van PE eiwitten, bleken vrijwel alle eiwitten via ESX-5 te worden getransporteerd. In **Hoofdstuk 3** is het effect van een defect ESX-5 systeem tijdens infectie onderzocht. Tegen de verwachting in bleek het niet kunnen uitscheiden van PE en PPE eiwitten te leiden tot hypervirulentie van *M. marinum* in volwassen zebrafissen. Waar een infectie met *M. marinum* gewoonlijk een chronisch ziekteverloop kent, werden vissen die geïnfecteerd waren met de mutant extreem snel zeer ziek. Door een snelle toename van het aantal bacteriën en vroege granuloomontwikkeling gingen deze vissen dan ook aanzienlijk sneller dood dan de controlevissen. De virulentie van de ESX-5-defecte *M. marinum* stam bleek in humane macrofagen en zebrafissen embryo's niet te zijn aangedaan of zelfs verminderd ten opzichte van de ouderstam. Omdat het hypervirulente effect specifiek in de context van volwassen vissen tot uiting kwam, is vervolgens onderzocht of het adaptief immuunsysteem –dat niet aanwezig is in embryo's- hierbij een rol speelde. Dit bleek niet het geval, waardoor de oorzaak van de hypervirulentie in deze studie niet kon worden opgehelderd. In **Hoofdstuk 4** heeft het onderzoek naar ESX-5 een vervolg gekregen. Hierbij werd de hypothese opgesteld dat ESX-5 betrokken is bij het teweegbrengen van een latente infectie, waarbij een defect in dit systeem zou kunnen leiden tot het aanhouden van actieve celdeling van de bacterie en inductie van acute in plaats van chronische ziekte. Bij een latente infectie bereiken de mycobacteriën een staat van niet-replicerende persistentie (dormantie), wat gepaard gaat met een ophoping van triacylglyceriden (TAG) die bestaan uit vetzuren. Deze vetzuren zijn in grote hoeveelheden aanwezig in de immuuncellen van het granuloom en kunnen worden opgenomen door mycobacteriën tijdens een infectie. Onderzoek met fluorescent gelabelde vetzuren, dat in hoofdstuk 4 is beschreven, wees uit dat de ESX-5-defecte *M. marinum* stam sterk verminderd in staat was deze vetzuren op te nemen. Dit zou erop kunnen wijzen dat deze stam mogelijk de dormante staat niet bereikt en daardoor hypervirulent is. Het ESX-5-afhankelijke PPE eiwit LipY, waarvan al eerder is aangetoond dat het een rol speelt in vetmetabolisme, bleek bij opname van vetzuren betrokken te zijn. Via een slimme klonerings-strategie, waarbij het C-terminale (actieve) gedeelte van LipY werd gefuseerd aan het PPE domein van het ESX-1-afhankelijke eiwit PPE68, kon dit fusie-eiwit op het oppervlak van *M. marinum* worden gebracht. Hierbij werd de transportroute van LipY gewijzigd van ESX-5 naar ESX-1, waardoor de functie van dit eiwit ook in ESX-5-defecte bacteriën onderzocht kon worden en een rol in vetzuuropname kon worden vastgesteld. Naast het onderzoek naar de oorzaak van hypervirulentie van de ESX-5 mutant, geeft hoofdstuk 4 ook een gedetailleerde beschrijving van de granulomen die in *M. marinum*-

geïnficeerde zebravissen worden gevormd. Voor het eerst kon worden aangetoond dat deze granulomen een zeer grote gelijkenis vertonen met de humane TB granulomen, door de aanwezigheid van T cellen, specifieke typen macrofagen en de hypoxische kern. In **Hoofdstuk 5** verschuift het accent naar het type VII eiwit transportsysteem ESX-1. Dit systeem is een van de belangrijkste factoren in de ziekteverwekkende capaciteit van pathogene mycobacteriën. Door het gentranscriptiepatroon van ESX-1-defecte *M. tuberculosis* en *M. marinum* mutanten te vergelijken met die van de ouderstammen, werd duidelijk dat de coderende genen van de bekende substraten van ESX-1 sterk verminderd tot expressie kwamen in de mutanten. Van andere, onbekende genen waarvan de transcriptieniveaus eveneens verlaagd waren, werd vervolgens getest of de eiwitten waarvoor ze coderen ook via ESX-1 konden worden getransporteerd. Dit heeft geresulteerd in de identificatie van EspJ als een nieuw ESX-1-substraat. Daarnaast bleek uit het genexpressie-profiel van *M. marinum* dat het *espACD* operon een belangrijke rol speelt in *esx-1*-gereguleerde processen tijdens infectie van macrofagen. Deze resultaten geven belangrijke inzichten in ESX-1 op regulatie- en secretieniveau. Het bestuderen van genexpressie profielen werd mogelijk gemaakt door het gebruik van RNA sequencing (RNAseq) technologie. In **Hoofdstuk 6** is een soortgelijke techniek ingezet om de sequentie van genomisch DNA te bepalen. De volledige nucleotidevolgorde van de *M. marinum* wild-type stam E11 is hierbij opgehelderd. Het doel van de studie die dit hoofdstuk beschrijft, was het in kaart brengen van de virulentiefactoren die deze *M. marinum* E11 stam gebruikt in fagocyterende cellen van verschillende gastheren. Om elk van de 5335 genen te kunnen onderzoeken, werd gebruik gemaakt van een verzameling van meer dan 100.000 verschillende *M. marinum* transposon mutanten. Door dit hoge aantal kon van de meeste genen de aanwezigheid van een of meerdere transposon mutanten in de totale groep mutanten verwacht worden. Met behulp van TraDIS (transposon-directed insertion site sequencing) werd de exacte plaats van alle transposon inserties in het genoom bepaald en kon direct worden vastgesteld welke genen essentieel waren voor overleving van de bacterie, omdat hier geen of weinig transposon inserties in terug gevonden konden worden. De verzameling mutanten werd vervolgens gebruikt om fagocyterende cellen van de mens, de muis, de vis en twee soorten amoeben te infecteren. Na deze infecties werd van de overlevende bacteriën opnieuw de genomische locatie van alle transposon inserties bepaald, en konden deze worden vergeleken met de verzameling mutanten die aanwezig was vóór infectie. Op deze manier kon voor elk gen worden vastgesteld of het betrokken was bij infectie van een of meerdere soorten gastheren. Uit de data konden nieuwe virulentiefactoren worden herleid, zoals dit hoofdstuk laat zien voor het *cpsA* gen. Daarnaast toont de identificatie van essentiële genen en algemene virulentiefactoren zoals polyketide biosynthese, type VII eiwitsecretie en gebruik van (chole)sterol, dat *M. marinum* en *M. tuberculosis* veel gelijkenissen vertonen. Omdat *M. marinum* in staat is een breed scala aan verschillende gastheren te infecteren, biedt deze studie ook een goed inzicht in de adaptatie van de pathogeen aan zijn gastheer vanuit een evolutionair oogpunt. Zo blijkt *M. marinum* een grote set gastheer-specifieke virulentiefactoren te bevatten, waaronder eiwitten die betrokken zijn bij de modificatie

van glycolipiden op het celoppervlak en vitamine B12 biosynthese eiwitten. Verrassend genoeg blijken bepaalde ESX-1-geassocieerde eiwitten een wisselend effect te hebben op de infectie van verschillende gastheren, wat suggereert dat een nauwkeurige afstemming van het secretiesysteem via deze eiwitten bepalend is voor virulentie. Deze resultaten onderstrepen het tot dusver ondergewaardeerde belang van de ESX-1-geassocieerde eiwitten. Met de genoom-brede identificatie van essentiële genen en virulentiefactoren van *M. marinum*, heeft deze studie een grote hoeveelheid waardevolle informatie opgeleverd. Op de bevindingen die in het gehele proefschrift zijn beschreven wordt dieper ingegaan in **Hoofdstuk 7**. Deze algemene discussie plaatst de verkregen resultaten in een bredere context en gaat verder in op enkele onbelichte punten.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift verschillende experimentele studies gericht op het karakteriseren van virulentiefactoren van pathogene mycobacteriën. Deze onderzoeken hebben een belangrijk inzicht geleverd in de functionaliteit van de ESX-5 en ESX-1 eiwit-transportssystemen. Daarnaast heeft dit proefschrift geleid tot een grote hoeveelheid waardevolle informatie over de gastheer-specifieke virulentiefactoren van *M. marinum*. De kennis die met deze studies is verkregen laat zien dat virulentie van pathogene mycobacteriën gebaseerd is op een zeer fijne balans; een verstoring van deze balans kan al snel leiden tot attenuatie of in zeldzame gevallen tot hypervirulentie. De resultaten die zijn voortgekomen uit de onderzoeken beschreven in dit proefschrift kunnen aanknopingspunten bieden voor de ontwikkeling van nieuwe vaccins, bijvoorbeeld door middel van het uitschakelen van nieuwe kandidaat virulentiefactoren, en een ingang bieden voor nieuwe therapeutische strategieën gericht op een effectievere behandeling van TB.



