



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A proteomic portrait of *Mycobacterium tuberculosis*

Keijzer, J. de

Citation

Keijzer, J. de. (2019, June 6). *A proteomic portrait of Mycobacterium tuberculosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/73850>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/73850>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/73850> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Keijzer, J. de

Title: A proteomic portrait of Mycobacterium tuberculosis

Issue Date: 2019-06-06



Nederlandstalige samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

Nederlandstalige samenvatting

Algemene inleiding

Tuberculose (TB) is een ernstige infectieziekte die veroorzaakt wordt door *Mycobacterium tuberculosis*. Wereldwijd worden er jaarlijks ruim 10 miljoen nieuwe gevallen van actieve TB gediagnosticeerd. Ondanks dat er sinds de jaren 50 meerdere medicijnen op de markt zijn gekomen om TB succesvol te behandelen, eist deze ziekte nog altijd vele mensenlevens, met een geschat aantal sterfgevallen van 890.000 mannen, 490.000 vrouwen en 140.000 kinderen per jaar. Hiermee is TB wereldwijd de meest dodelijke bacteriële infectieziekte. Buiten deze hoge sterftecijfers zijn er naar schatting wereldwijd nog ca. twee miljard individuen die een latente vorm van TB bij zich dragen, waarbij *M. tuberculosis* in een soort slapende toestand aanwezig is. Van deze twee miljard mensen zal uiteindelijk 3-30% actieve TB ontwikkelen en deze gevallen kunnen opnieuw voor verspreiding van de ziekte zorgen. Hoewel TB wereldwijd nog steeds veel slachtoffers eist, is er in de Westerse wereld sinds halverwege de 20ste eeuw, met de introductie van antibiotica, een gestage afname van het aantal TB infecties.

Momenteel is TB in het algemeen goed te behandelen met werkzame antibiotica. De huidige eerstelijns antibiotica worden echter al ruim 50 jaar gebruikt voor de behandeling van TB. Tijdens dit tijdsbestek zijn er antibiotica resistente vormen van TB ontstaan. Wereldwijd wordt momenteel in 3.5% van alle TB gevallen een vorm van TB gevonden die resistent is voor tenminste rifampicine en isoniazide, de twee belangrijkste eerstelijns antibiotica voor de behandeling van TB. Deze vorm van antibiotica resistente TB staat bekend als Multidrug Resistant TB (MDR-TB). Wanneer er sprake is van additionele resistentie tegen fluoroquinolonen en aminoglycosiden wordt deze vorm van TB extensively drug resistant (XDR-TB) genoemd. Tenslotte is er ook totally drug resistant TB (TDR-TB); een verzamelnaam voor TB gevallen die resistentie hebben ontwikkeld tegen alle beschikbare TB antibiotica waar in een bepaalde setting op getest kan worden. Vanwege het beperkte aantal nieuwe anti-TB medicamenten dat op de markt komt, is er een groeiende angst dat MDR-TB, XDR-TB en TDR-TB uitbraken vaker voor zullen komen en moeilijker te bestrijden worden.

MDR-TB gevallen komen relatief vaak voor in Centraal-Azië en Oost-Europese landen. Zo is beschreven dat in Wit-Rusland bij 35% van alle nieuwe TB gevallen er sprake is van MDR-TB. Dit betekent dat resistente vormen van TB actief worden overgedragen. De verspreiding van MDR-TB wordt in Wit-Rusland, Europa, Zuid-Afrika en grote delen van Azië vaak geassocieerd met het Beijing genotype van *M. tuberculosis*, dat in 1995 door het RIVM werd beschreven. Hoewel dit genotype genetisch niet veel verschilt van andere *M. tuberculosis* stammen, vertonen stam-

men van het Beijing genotype een hogere antibiotica tolerantie, een hogere pathogeniciteit en een afwijkende inductie van immuunresponsen in diverse gastheren, waaronder de mens. Vanwege de toenemende antibioticaresistentie bij TB is het belangrijk om verdere verspreiding van resistente bacteriën te voorkomen. Verbetering van de huidige diagnostiek, behandelstrategieën en de ontwikkeling van nieuwe medicijnen kunnen hiertoe bijdragen.

Dit proefschrift

Eiwitten zijn relatief grote biomoleculen die verantwoordelijk zijn voor allerlei processen in de bacteriële cel, zoals energiehuishouding, celdeling, infectie van de gastheer en ontwikkeling van antibioticaresistentie. Het proteoom, bestaande uit de eiwitten die aanwezig zijn in de cel op een specifiek moment, bepaalt voor een groot deel de eigenschappen van de cel. Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift werd uitgevoerd om een completer beeld te krijgen van de mycobacteriële eiwitten die van belang zijn voor de ontwikkeling van antibioticaresistentie en verspreiding van TB. Daarnaast is er gekeken naar toepassingen in de diagnostiek.

Een *M. tuberculosis* genotype dat zich de laatste decennia snel verspreid heeft is de ‘moderne’ of ‘typische’ Beijing lineage. Deze typische Beijing genotype familie is in een veelheid aan studies geassocieerd met antibioticaresistentie, de inductie van een alternatieve immuunrespons en een verhoogde prevalentie, terwijl deze genotype familie genetisch zeer sterk geconserveerd is. Tezamen zijn dit sterke aanwijzingen dat de typische Beijing genotype familie een evolutionair voordeel heeft ten opzichte van andere *M. tuberculosis* families.

In **hoofdstuk 2** is onderzocht of er eiwitten aanwezig zijn in het proteoom van de typische Beijing genotype familie die deze stammen een evolutionair voordeel geven. Hiervoor is het proteoom van typische Beijing isolaten vergeleken met het proteoom van atypische Beijing isolaten. De atypische, of ‘ancient’ Beijing familie is evolutionair gezien van alle *M. tuberculosis* families het meest verwant aan de typische Beijing genotype familie. De atypische Beijing genotype familie is echter niet zo sterk geassocieerd met een verhoogde prevalentie en antibioticaresistentie als de typische Beijing strain.

Uit de resultaten bleek dat het proteoom van de onderzochte typische en atypische Beijing isolaten in grote mate overeenkomstig zijn. Slechts vier eiwitten kwamen in verschillende relatieve hoeveelheden voor in stammen van beide families: Rv0450c/MmpL4, Rv1269c, Rv3137, and Rv3283/sseA. Transcriptionele en functionele analyse van deze vier eiwitten in een cohort van 29 klinische Beijing isolaten liet zien dat typische Beijing isolaten meer Rv0450c/MmpL4 tot expressie brengen dan de geteste atypische Beijing isolaten. Rv0450c/MmpL4 is betrokken

bij de ijzerhuishouding van *M. tuberculosis*. De verhoogde aanwezigheid van Rv0450c/MmpL4 eiwit en mRNA in typische Beijing isolaten is een eerste verklaring waarom individuen met een mutatie in SLC11A1/NRAMP1, een eiwit dat betrokken is bij de ijzerhuishouding in de gastheer, een verhoogde kans op een infectie met Beijing stammen hebben.

In tegenstelling tot Rv0450c/MmpL4, was het eiwit Rv3283/sseA verminderd aanwezig in de onderzochte typische Beijing isolaten. Uit de bioinformatische analyse, beschreven in **hoofdstuk 2**, blijkt dat de verminderde aanwezigheid van Rv3283/sseA in typische Beijing isolaten ten opzichte van atypische Beijing isolaten veroorzaakt wordt door een specifieke mutatie in typische Beijing stammen, die een instabiliteit van het eiwit veroorzaakt. Daarmee demonstreert deze studie een direct verband tussen het afwijkende genotype en fenotype van typische Beijing stammen ten opzichte van de nauwverwante atypische Beijing stammen.

De bevinding dat de relatieve kwantiteit van Rv0450c/MmpL4 en Rv3283/sseA verschilt tussen typische en atypische Beijing isolaten is een eerste stap om de hogere prevalentie van typische Beijing stammen te verklaren aan de hand van het mycobacteriële fenotype. Echter biedt het nog geen verklaring voor de correlatie met antibioticaresistentie. Om erachter te komen welke eiwitten een rol spelen bij de initiële respons van typische Beijing stammen op antibiotica is in **hoofdstuk 3** een typische Beijing stam blootgesteld aan een hoge concentratie rifampicine, één van de belangrijkste eerstelijns antibiotica voor de behandeling van TB.

Gedurende de eerste 24 uren na blootstelling aan rifampicine steeg de relatieve hoeveelheid van zogenaamde ‘dormancy regulon encoded genes’ (DosR) in het proteoom van typische Beijing stammen opvallend veel. DosR genen komen sterk verhoogd tot expressie komen wanneer de bacterie in een zuurstofarm milieu terecht komt. Door de aanwezigheid van DosR eiwitten zal *M. tuberculosis* snel in een latente of ‘dormancy’ fase terechtkomen, waarin deze minder vatbaar is voor antibiotica. Door blootstelling aan rifampicine steeg niet alleen de relatieve hoeveelheid DosR eiwitten. Na het bestuderen van fenotypische dormancy markers bleek ook dat de gehele kweekpopulatie van het onderzochte typische Beijing isolaat een pre-dormant fenotype heeft dat nog ‘meer’ dormant wordt na blootstelling aan rifampicine. De bevinding dat DosR eiwitten een belangrijke rol spelen bij de initiële respons van typische Beijing stammen op antibiotica is nieuw en is een nog niet eerder beschreven manier van *M. tuberculosis* om op een actieve manier fenotypische antibiotica tolerantie te ontwikkelen.

In **hoofdstuk 4** is onderzocht of de initiële respons van typische Beijing stammen op rifampicine uniek is, of dat deze reactie ook waar te nemen is bij andere *M. tuberculosis* stammen. Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden is eerst het proteoom van een typische Beijing stam vergeleken met het proteoom van *M. tuberculosis* controle stam H37Rv, zowel voor- als na blootstelling

aan rifampicine. In beide *M. tuberculosis* stammen nam de relatieve hoeveelheid DosR eiwitten toe in de eerste 24 uur na blootstelling aan rifampicine. Echter, de relatieve hoeveelheid van meerdere DosR eiwitten was al hoger in typische Beijing stammen voordat rifampicine werd toegevoegd aan de kweek. Ook steeg de relatieve hoeveelheid van meerdere DosR eiwitten sneller in de onderzochte typische Beijing stam dan bij andere stammen. De verhoogde aanwezigheid van DosR eiwitten in typische Beijing stammen, nog voordat de bacterie in aanraking is gekomen met een antibioticum, duidt erop dat de typische Beijing stammen te allen tijde voorbereid zijn om effectief in een dormancy stadium over te gaan.

Om te bepalen of typische Beijing stammen relatief grote hoeveelheden DosR eiwitten bevatten t.o.v. andere stammen, werden meerdere DosR eiwitten gekwantificeerd in 27 klinische *M. tuberculosis* isolaten, afkomstig van vijf van de meest voorkomende *M. tuberculosis* geotype families. De regulatoire DosR eiwitten waren verhoogd aanwezig waren in zowel typische als atypische Beijing stammen. Deze observatie duidt op een evolutionair voordeel voor de gehele *M. tuberculosis* Beijing familie. Dit biedt deze specifieke *M. tuberculosis* genotype familie de mogelijkheid om te persisteren tijdens behandeling met antibiotica en resistentie te selecteren. Daarom staat de in dit proefschrift beschreven observatie mogelijk in direct verband met de associatie tussen Beijing stammen en antibioticaresistentie in diverse regio's in de wereld, waaronder Europa en Azië.

De bevinding dat eiwitten van het DosR regulon verhoogd aanwezig zijn in Beijing stammen biedt niet alleen een mogelijke verklaring voor de associatie tussen dit genotype en antibioticaresistentie, maar geeft ook een nieuwe kijk op huidige antibioticaresistentie testen. Een veelgebruikte test voor het bepalen van antibioticaresistentie is de Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. Hierbij wordt de antibioticaconcentratie bepaald waarbij de *M. tuberculosis* bacterie stopt met groeien. De aanname is dat boven de MIC de bacterie niet meer groeit omdat de concentratie antibiotica toxisch of remmend is voor het pathogeen. De bevindingen beschreven in dit proefschrift laten zien dat *M. tuberculosis* blootstelling aan antibiotica kan overleven doordat deze in een stadium van dormancy over gaat om zich te beschermen tegen de invloed van antibiotica, om later alsnog opnieuw uit te groeien. De mogelijkheid bestaat zelfs dat de bacterie vele malen hogere concentraties van antibiotica kan tolereren. Concluderend kan gesteld worden dat een MIC bepaling uitsluitend iets zegt over de laagste concentratie waarbij bacteriële groei geremd wordt, maar dat deze niet noodzakelijkerwijs direct verband houdt met het overleven van het pathogeen onder invloed van antibiotica. Deze observatie dient als mogelijke verklaring voor de vele TB relapsen na 'geslaagde' behandelingen.

Vanwege de toenemende mate van antibioticaresistentie wereldwijd en het feit dat de meeste beschikbare antibiotica met name werkzaam zijn tegen metabool actieve en delende mycobacteriën is het belangrijk om de zoektocht naar nieuwe antibiotica voort te zetten. Dit wordt

verder onderstreept door de in dit proefschrift beschreven bevindingen dat blootstelling aan antibiotica ook direct antibiotica tolerantie kan veroorzaken door het induceren van dormancy. Een medicijn dat mogelijk geschikt is voor de behandeling van dormant TB, MDR-TB, XDR-TB en mogelijk zelfs TDR-TB, is thioridazine. Thioridazine is een antipsychoticum dat met succes off-label gebruikt is voor de behandeling van XDR-TB patiënten en *in vitro* actief is tegen zowel metabool actieve als metabool inactieve, dormant, *M. tuberculosis*. Buiten de anti-TB activiteit van thioridazine, werkt dit middel synergistisch met reeds bestaande eerstelijns antibiotica. De theorie voor het werkingsmechanisme is dat het de effluxpompen (afvoerpompen) van bacteriën zou remmen, waardoor er een stapeling van stoffen als antibiotica zo ontstaan. Hoewel het potentieel van thioridazine als nieuw middel voor de behandeling van TB is aangetoond, zoals blijkt uit zowel *in vitro* als *in vivo* data, is het exacte mechanisme van thioridazine onbekend.

In **hoofdstuk 5** is onderzocht op welke manier thioridazine *M. tuberculosis* weet te bestrijden en waarom dit middel met name goed werkt in combinatie met andere antibiotica. Door het bestuderen van het *M. tuberculosis* proteoom in de aan- en afwezigheid van thioridazine is ontdekt welke eiwitten betrokken zijn bij het in stand houden van het pathogeen. De theorie als basis voor deze studie was dat eiwitten die differentieel tot expressie komen tijdens de behandeling met thioridazine betrokken zijn bij cellulaire processen die moeten compenseren voor de door het antibioticum toegebrachte schade.

Meerdere van de eiwitten die differentieel gereguleerd werden tijdens behandeling met thioridazine bleken betrokken bij het produceren en in stand houden van de celenvlop. Aan de hand van de gegenereerde proteomics data en beschikbare literatuur kwam de hypothese tot stand dat thioridazine de celenvlop van *M. tuberculosis* beschadigt. Analyse van de vetzuur compositie in de plasmamembraan van *M. tuberculosis* liet zien dat behandeling met thioridazine de relatieve hoeveelheid 'tuberculostearic acid' beïnvloedt, hetgeen kan wijzen op een verandering van de celenvlop permeabiliteit.

Als de celenvlop van *M. tuberculosis* permeabeler wordt, betekent dit dat antibiotica gemakkelijker de cel in komen om hun anti-TB functie uit te oefenen. Om te testen of langdurige blootstelling van *M. tuberculosis* aan thioridazine de permeabiliteit van de celenvlop inderdaad beïnvloedt, werd een cellulair assay ontwikkeld waarmee cel permeabiliteit en efflux pomp activiteit gemeten kan worden, omdat beide mechanismes bijdragen aan de accumulatie van componenten in de cel. Uit deze data bleek dat thioridazine de celenvlop permeabiliteit beïnvloedt, maar er werd geen direct bewijs gevonden dat thioridazine de activiteit van efflux pompen remt.

Aan de hand van de data uit **hoofdstuk 5** kan worden beredeneerd dat thioridazine *M. tuberculosis* kan doden doordat deze zich richt op de mycobacteriële celenvlop. Een verhoogde per-

meabiliteit van de celenvelop zorgt er ook voor dat andere antibiotica makkelijker accumuleren in de cel. Nu er een beter beeld is van het mechanisme van thioridazine kan dit hopelijk leiden tot beter, efficiënter gebruik van dit medicijn, of derivaten van dit veelbelovende medicijn.

Tenslotte is er binnen de studies in dit proefschrift gekeken hoe massaspectrometrie gebruikt kan worden voor de identificatie van mycobacteriën. Binnen het *Mycobacterium* geslacht zijn momenteel meer dan 140 species beschreven. Hoewel alle species binnen hetzelfde geslacht vallen als *M. tuberculosis*, zijn niet alle mycobacteriën van klinisch belang en zijn niet alle species gevoelig voor dezelfde antibiotica. Identificatie van het mycobacteriële species is van belang om tot een juiste behandeling van de patiënt te komen en de epidemiologie te begrijpen.

In **hoofdstuk 6** laten wij zien dat de mate van verwantschap tussen nauw verwante mycobacteriën bepaald kan worden met behulp van massaspectrometrie. De in dit proefschrift beschreven methode vergelijkt het aantal overeenkomstige tandem massaspectra tussen verschillende proteolytische digesten van de onderzochte mycobacteriële species. De voordelen van de beschreven methodologie ten opzichte van bestaande diagnostische technieken is dat er geen *a priori* kennis van het te identificeren pathogeen nodig is, de methode naar alle waarschijnlijkheid kan worden toegepast op andere micro-organismen, alle tandem massaspectra gebruikt kunnen worden voor het clusteren van de verschillende species en dat de methode werkt op zowel hoge als lage resolutie massa spectrometers.

De limitaties en verdere mogelijkheden van de methode beschreven in **hoofdstuk 6** en **hoofdstuk 7** zullen verder onderzocht moeten worden voordat overwogen kan worden of deze benadering in een klinische setting toegepast kan worden. Desalniettemin kan op basis van de in dit proefschrift beschreven informatie geconcludeerd worden dat deze methode de potentie heeft om onze kennis omtrent de fenotypische verwantschap tussen de verschillende mycobacteriële species te vergroten. Hoewel er in **hoofdstuk 6** uitsluitend een 'proof of principle' van de methode is gedemonstreerd, zou het principe van deze techniek gebruikt kunnen worden voor snellere en accurate identificatie van pathogenen. Uiteindelijk zal dit kunnen leiden tot een effectievere behandeling van patiënten met infecties van nontuberculeuze mycobacteriën in de toekomst.

Conclusie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift biedt inzicht in de moleculaire mechanismes die betrokken zijn bij het ontstaan rifampicine tolerantie; de limitaties van de huidige antibiotica gevoeligheidstesten; inter- en intra-stam variatie binnen de *M. tuberculosis* genus; het anti-my-

cobacteriële mechanisme van thioridazine en potentiële nieuwe diagnostische methoden voor identificatie. Deze bevindingen onderstrepen dat antibioticaresistentie niet enkel een genetisch probleem is, maar dat eiwit regulatie een belangrijke rol speelt bij de totstandkoming van antibioticaresistentie. Hoewel dit proefschrift aantoont dat het fenotype van Beijing stammen er voor zorgt dat dit pathogeen relatief goed bestand is tegen veel van de momenteel beschikbare antibiotica, laten de uitkomsten van dit proefschrift ook zien dat wanneer kennis met betrekking tot het ontstaan van antibioticaresistentie wordt vergroot, nieuwe verbeterde diagnostische- en behandelmethodes aan de horizon zullen verschijnen.