



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Boosting the host immune system to fight tuberculosis

Boland, R.

Citation

Boland, R. (2022, April 28). *Boosting the host immune system to fight tuberculosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3289526>

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/1887/3289526>

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

A

Addendum

Nederlandse samenvatting

De wetenschap speelt een belangrijke rol in de vooruitgang van de mensheid. Een belangrijk aspect van die vooruitgang is dat deze de gehele mensheid bedient, niet slechts zij die de wetenschap kunnen doorgronden. Uitvindingen zoals de smartphone en het internet zijn niet meer weg te denken uit de hedendaagse maatschappij, maar waren niet mogelijk geweest zonder wetenschappelijke ontdekkingen. Zo ook de ontwikkeling van meerdere goed werkende vaccins tegen Covid-19 in een tijdsbestek van minder dan een jaar: wat mij betreft een prachtig voorbeeld van hoe wetenschappers, met voldoende middelen en samenwerking, grote problemen voor de mensheid het hoofd kunnen bieden. Evenwel zoekt de wetenschap nog altijd oplossingen voor veel oudere levensbedreigende infectieziekten, waaronder tuberculose, het onderwerp van mijn proefschrift. Naast vertrouwen is er ook scepsis over wetenschap en wordt deze steeds vaker in twijfel getrokken. Hierom, en ook omdat wetenschap doorgaans betaald wordt uit publieke middelen, ligt er voor wetenschappers een belangrijke taak om hun werk breed te delen. Zo kunnen zij ook aan het grote publiek uitleggen welke resultaten zij behaald hebben en hoe die de mensheid verder kunnen helpen. In deze samenvatting van mijn proefschrift wil ik mijn werk breder delen en vertellen hoe wetenschappelijk onderzoek naar tuberculose kan bijdragen aan nieuwe behandelmethoden.

Iedere dag worden we blootgesteld aan tal van mogelijke ziekteverwekkers zoals bacteriën, virussen en schimmels. Gelukkig worden we daar zelden ziek van, een verdienste van ons immuunsysteem. Het menselijk immuunsysteem bestaat uit twee belangrijke routes: de aangeboren immuniteit en de adaptieve immuniteit. In eerste instantie zullen ziekteverwekkers die ons lichaam weten binnen te dringen, te maken krijgen met het aangeboren immuunsysteem. Cellen en eiwitten proberen zo snel mogelijk de ziekteverwekkers onschadelijk te maken. Als de reactie van het aangeboren immuunsysteem niet afdoende is om een infectie te neutraliseren, dan komt het adaptieve immuunsysteem in actie. Dit immuunsysteem bestaat uit gespecialiseerde cellen die een grote diversiteit aan ziekteverwekkers specifiek kunnen herkennen en neutraliseren. Ook bezit het adaptieve immuunsysteem een geheugen. Hierdoor wordt een volgende infectie met dezelfde ziekteverwerker sneller door het immuunsysteem aangepakt. Dit is het principe achter vaccinaties: hiermee trainen we ons adaptieve immuunsysteem om een ziekteverwerker waar we nog niet mee in aanraking zijn gekomen te herkennen. Als deze ziekteverwerker op een later moment toch ons lichaam weet binnen te dringen, dan is de immunreactie door dit geheugen een stuk sneller gemobiliseerd. Vrijwel alle organismen bezitten een vorm van het aangeboren immuunsysteem, maar alleen gewervelde dieren zoals de mens bezitten ook een adaptief immuunsysteem.

Tuberculose, waarnaar ik in dit proefschrift onderzoek doe, is een infectieziekte die wordt veroorzaakt door een bacterie die zich voornamelijk nestelt in de longen. Deze bacterie verspreidt zich via de lucht en is bijzonder goed in staat om zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem om de tuin te leiden. Ingeademde bacteriën zullen in eerste instantie door een bepaald type cellen van het aangeboren immuunsysteem worden aangevallen. Macrofagen, zoals dit type cel heet en wat Grieks is voor grote eters, omsluiten daarbij de bacteriën en nemen deze vervolgens op, als ware het ze de bacterie opeten. Dit proces leidt uiteindelijk tot de vorming van structuren van geïnfecteerde macrofagen en andere cellen in de longen en andere organen van geïnfecteerde mensen. In deze structuren, waar een soort schild omheen zit, blijven de bacteriën afgeschermd van andere gezonde cellen. Deze structuren, die granulomen genoemd worden, beschermen aan de ene kant de gastheer door de ziekteverwerkers af te schermen, maar aan de andere kant worden deze granulomen door de bacteriën

gebruikt als een veilige plek om te verblijven en zich verder te verspreiden. Het is een evenwicht tussen de bacterie en het immuunsysteem. Bacteriën in granulomen kunnen maanden of zelfs jaren niet actief zijn. Er wordt geschat dat er zo'n 2 miljard mensen een niet-actieve tuberculose-infectie hebben. Iemand kan jaren rondlopen met een infectie zonder hier last van te hebben. Als het evenwicht verstoord wordt, bijvoorbeeld omdat iemand een verzwakt immuunsysteem ontwikkelt door een HIV-besmetting, dan kan de infectie weer opvlammen en leiden tot actieve tuberculose. Jaarlijks krijgen zo'n 10 miljoen mensen actieve tuberculose en overlijden er 1,4 miljoen aan deze ziekte.

Tegen tuberculose is het zogenaamde BCG-vaccin beschikbaar. Dit vaccin is inmiddels al een eeuw oud en biedt slechts gedeeltelijke bescherming. Ondanks inzet van de wetenschap om nieuwe vaccins tegen tuberculose te ontwikkelen, bestaat er tot op heden nog geen effectief vaccin. De bacterie die tuberculose veroorzaakt is daarbij ook steeds vaker minder gevoelig voor antibiotica. Dit maakt dat tuberculose moeilijk te behandelen is: een kuur tegen tuberculose bestaat uit vier verschillende antibiotica die men zes maanden moet slikken. Omdat antibiotica steeds minder effectief zijn tegen de tuberculosebacterie en er nog geen effectieve vaccins zijn, wordt veel onderzoek gedaan naar nieuwe medicijnen. Een bijzondere interesse is er voor medicijnen die op de gastheer zelf gericht zijn. Deze medicijnen vallen niet direct de bacterie aan, zoals antibiotica dat wel doen, maar proberen het evenwicht te laten doorslaan in het voordeel van het immuunsysteem. In het bijzonder is daarbij aandacht voor medicijnen die werken op het aangeboren immuunsysteem, zoals op macrofagen, waardoor die beter in staat worden de bacterie te doden.

Het werk in dit proefschrift beschrijft het gebruik van een klein subtropisch visje uit zuidoost Azië om nieuwe medicijnen tegen tuberculose te onderzoeken: de zebravis. Deze vis is zeer bekend onder aquarium-enthousiastelingen en is in vrijwel iedere dierenwinkel te vinden. In de wetenschap wordt dankbaar gebruik gemaakt van dit visje als modelorganisme. Een modelorganisme wordt gebruikt om bijvoorbeeld ziekten te onderzoeken. De zebravis heeft een aantal eigenschappen die dit dier bijzonder geschikt maken als modelorganisme. Zo zijn de embryo's en larven van dit visje transparant, waardoor we met moleculair celbiologische technieken en gereedschappen zoals fluorescentiemicroscopie op subcellulair niveau kunnen zien wat er gebeurt. Een tweede belangrijke eigenschap is dat het aangeboren immuunsysteem in zebravisembryo's direct actief is, terwijl het adaptieve immuunsysteem pas actief wordt in larven van zo'n twee weken oud. Hierdoor kunnen we tijdens de eerste dagen van de ontwikkeling de complexe interactie tussen ziekteverwekkers en het aangeboren immuunsysteem bijzonder goed bestuderen. Hoewel een vis geen longen heeft, is er een natuurlijke ziekteverwekker voor vissen die nauw verwant is aan de bacterie die tuberculose veroorzaakt. Injectie met deze bacterie leidt tot vergelijkbare granuloomachtige structuren als die bij tuberculosepatiënten in bijvoorbeeld longweefsel te vinden zijn. De zebravis is daarom bij uitstek geschikt voor het werk dat in dit proefschrift gedaan is.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van enkele reeds bestaande medicijnen voor verschillende aandoeningen, waarvan nu getracht wordt deze te gebruiken tegen tuberculose. Het voordeel hiervan is dat deze medicijnen vaak al jaren in de kliniek gebruikt worden, waardoor de veiligheid al bekend is. De werking van deze medicijnen kan ook effectief zijn tegen infecties met de tuberculosebacterie als bepaalde immunogelateerde mechanismen door deze medicijnen kunnen worden versterkt. Ook worden in **hoofdstuk 1** de voordelen van de zebravis als modelorganisme besproken.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe door automatisering het onderzoek met het

zebravismodel vergemakkelijkt kan worden. Door gebruik te maken van robots die de zebravisembryo's injecteren met stoffen die gebruikt worden voor genetische manipulatie kan een grotere doorvoersnelheid behaald worden ten opzichte van manuele injectie. Deze genetische manipulatie stelt ons bijvoorbeeld in staat om specifieke genen uit te schakelen, waardoor we de werking van dat gen kunnen bestuderen. Dat maakt het bijvoorbeeld mogelijk om meer over het immuunsysteem te leren door genen gerelateerd aan het immuunsysteem uit te schakelen. In het bijzonder wordt in **hoofdstuk 2** de efficiëntie van de injectierobot verbeterd door gebruik te maken van beeldherkenningssoftware om preciezer te kunnen injecteren. De injectierobot die gebruikt is voor deze studie, is ook in staat om zebravisembryo's te injecteren met de tuberculosebacterie, een noodzakelijke stap voor het onderzoek met het zebravismodel voor tuberculose. Helaas was de injectierobot nog niet precies genoeg om een succesvolle infectie in de bloedbaan te bewerkstelligen wat een vereiste was voor het werk in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3** wordt gekeken wat de beste methode is om de zebravisembryo's te infecteren om effectieve screens (onderzoeken waarbij veel medicijnen getest worden) voor medicijnen tegen tuberculose te kunnen uitvoeren. Hiervoor worden verschillende manuele infectietechnieken met elkaar vergeleken. Na infectie wordt een behandeling gestart met potentiële nieuwe medicijnen die op de gastheer gericht zijn. We gebruiken daarbij medicijnen waarvan we, door experimenten waarbij gebruik gemaakt is van menselijke cellen, al verwachten dat ze effectief zijn. Nadat de beste methode werd gevonden, zijn verschillende nieuwe medicijnen geprobeerd in een kleine pilot studie. Dat resulteert in drie medicijnen die effectief zijn in het verlagen van de tuberculose-infectie in het zebravismodelorganisme. Dit zijn Trifluorperazine, Tamoxifen en Amiodarone.

Een belangrijk cellulair mechanisme dat de balans in onze cellen bewaart is autofagie. Dit mechanisme ruimt ongewenste deeltjes in cellen op, zo ook bacteriën die zich in onze cellen bevinden. Deze ongewenste deeltjes worden in blaasjes opgenomen waarna ze samengaan met lysosomen, blaasjes met een zeer zure inhoud, waardoor de ongewenste deeltjes worden afgebroken. Deze afbraakmachinerie is daardoor een interessant mechanisme dat bij activering het evenwicht tussen immuunsysteem en bacterie in het voordeel van het immuunsysteem kan doen kantelen. Van de drie gevonden medicijnen worden Tamoxifen en Amiodarone in wetenschappelijke vakliteratuur al gelinkt aan het activeren van autofagie.

Tamoxifen is een medicijn dat gebruikt wordt in de behandeling van borstkanker. In **hoofdstuk 4** onderzoeken wij of Tamoxifen ook gebruikt kan worden als een gastheer-gericht medicijn in de behandeling van tuberculose. We testen of Tamoxifen niet mogelijk direct op bacteriën werkt als een antibioticum, wat niet het geval is bij de behandeldosis waarin we nog steeds een verlaging van de bacteriële infectie zien. Vervolgens proberen we uit te zoeken welke cellulaire mechanismen precies door Tamoxifen geactiveerd worden. Het is bekend dat Tamoxifen werkt via de oestrogeenreceptor. Een receptor bevindt zich doorgaans in het celmembraan en kan daar moleculaire signalen van buiten de cel opvangen. Receptoren zijn zeer precies, het is een puzzelstukje dat niet zomaar overal op past. Ook in een zebravislijn waarin de oestrogeenreceptor deels is uitgeschakeld, blijkt behandeling met Tamoxifen nog steeds te werken tegen de tuberculosebacterie. Dit duidt erop dat Tamoxifen via een ander mechanisme effect uitoefent op het immuunsysteem. We komen erachter dat Tamoxifen niet alleen in staat is om autofagie te activeren, maar ook het aantal lysosomen doet toenemen. De werking van Tamoxifen kan daardoor mogelijk verklaard worden door een toename van de afbraak van tuberculosebacteriën.

Vervolgens behandelen we in **hoofdstuk 5** met tuberculosebacteriën geïnfecteerde zebravis-embryo's met Amiodarone. Dit medicijn, dat al jaren gebruikt wordt bij de behandeling van hartritmestoornissen, activeert net als Tamoxifen autofagie en leidt tot een toename van het aantal stikstofradicalen in cellen. Stikstofradicalen zijn ook een belangrijk mechanisme waarmee bacteriën gedood kunnen worden. We kijken daarom eerst of deze toename in stikstofradicalen de verklaring kan zijn van de verminderde bacteriële infectie. Dit blijkt echter geen volledige verklaring te bieden voor het effect van Amiodarone: ook als we de stikstofradicalen met een tweede medicijn onschadelijk maken, blijft Amiodarone de bacteriële infectie verlagen. Nadere studie laat zien dat ook Amiodarone, net als Tamoxifen, het aantal lysosomen doet toenemen, zodat verhoogde afbraak van tuberculosebacteriën in lysosomen mogelijk de werking van Amiodarone verklaart.

Voordat Tamoxifen of Amiodarone gebruikt kunnen worden voor de behandeling van tuberculose is meer onderzoek nodig. Maar samen laten de resultaten uit **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5** zien dat autofagie en de lysosomale afbraak bijzonder interessante mechanismen zijn om te activeren met gastheer-gerichte medicijnen om tuberculose te behandelen. Hoewel de moleculaire mechanismen van Tamoxifen en Amiodarone verschillen, weten ze beiden hetzelfde effect te sorteren. Die kennis kan gebruikt worden om te zoeken naar andere medicijnen die vergelijkbare mechanismen activeren. In **hoofdstuk 6** worden de resultaten en inzichten uit dit proefschrift in het perspectief geplaatst van de huidige kennis over gastheer-gerichte medicijnen.

