



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Advancing host-directed therapy for *Mycobacterium avium* infection: identification of drug candidates and potential host targets

Kilinc, G.

Citation

Kilinc, G. (2025, November 6). *Advancing host-directed therapy for Mycobacterium avium infection: identification of drug candidates and potential host targets*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4282119>

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/1887/4282119>

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



Nederlandse samenvatting
Dankwoord
List of publications
Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting

Mycobacterium avium (*Mav*) behoort tot de groep van niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) en is binnen deze groep de meest voorkomende oorzaak van ernstige en chronische longziekten. Longziekte is de meest voorkomende ziekte door een *Mav*-infectie en treft met name personen met onderliggende longaandoeningen, zoals taaislijmziekte of chronische obstructieve longziekte (COPD), maar ook ogenschijnlijk gezonde individuen kunnen aan een *Mav*-gerelateerde ziekte lijden. Alhoewel infectie van de longen het meest voorkomt, kan *Mav* ook infecties van lymfeklieren, botten, gewrichten, huid en het maagdarmkanaal veroorzaken. De incidentie van zowel *Mav*-infecties als *Mav*-geïnduceerde longziekte neemt wereldwijd toe, wat een groeiende uitdaging vormt voor de volksgezondheid.

De geadviseerde behandeling van *Mav*-infecties bestaat uit een langdurige combinatietherapie van antibiotica zoals macroliden, ethambutol en rifamycines. *Mav* is van nature echter zeer tolerant tegen deze medicijnen en vergaarde resistentie kan deze ongevoeligheid verder versterken. Hierdoor zijn deze behandelingen vaak onvoldoende effectief om de infectie volledig onder controle te krijgen. Daarnaast dragen de lange behandelduur en de bijbehorende bijwerkingen aan een verminderde therapietrouwheid, wat de effectiviteit van de behandeling verder ondermijnt. Er is daarom een dringende behoefte aan alternatieve therapeutische strategieën die deze beperkingen kunnen ondervangen en de controle van infectie kunnen verbeteren.

Het immuunsysteem van de gastheer speelt een cruciale rol in de afweer tegen mycobacteriële infecties zoals *Mav*. Na inhalatie via aerosolen bereiken *Mav*-bacteriën de longen, waar alveolaire macrofagen een essentiële verdedigingslinie vormen. Deze immuuncellen herkennen *Mav* via diverse celreceptoren, wat leidt tot opname (fagocytose) van de bacteriën. Binnen deze cellen worden de bacteriën vervolgens afgebroken in fagolysosomen, waarbij onder andere reactieve zuurstofradicalen (ROS) worden ingezet als afweermechanisme. *Mav* beschikt echter over verschillende strategieën om deze immuunresponsen te omzeilen en te kunnen overleven in de macrofagen. Een veelbelovende benadering voor de behandeling van *Mav* is daarom gastheergerichte therapie (host-directed therapy: HDT), die zich richt op het moduleren van de immuunrespons van de gastheer. HDT kan daarbij zowel weefselschade als gevolg van een overmatige immuunreactie beperken, als de intracellulaire klaring van de bacterie versterken. Doordat HDT zich niet rechtstreeks op de bacterie richt, is het risico op resistentieontwikkeling minimaal en kunnen ook resistentie bacteriën bestreden worden. HDT heeft daarmee de potentie om, als aanvulling op antibiotica therapieën, de effectiviteit van de behandeling van *Mav*-infecties te verbeteren.

Onderzoek naar HDT bij *Mav*-infecties staat echter nog in de kinderschoenen in vergelijking met onderzoek naar HDT voor *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), de veroorzaker van tuberculose. Dit wordt duidelijk in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift, waarin we met een uitgebreid literatuuroverzicht de bestaande HDT-strategieën en veelbelovende gastheertargets bij mycobacteriële infecties presenteren. Daaruit blijkt dat, hoewel er veel bekend is over de interacties tussen gastheer en *Mtb* en HDT bij *Mtb* al uitvoerig is onderzocht, de kennis over *Mav* aanzienlijk beperkter is. Dit benadrukt de urgentie van verder onderzoek naar de gastheermechanismen die betrokken zijn bij *Mav*-infecties en die als aangrijpingspunt kunnen dienen voor de ontwikkeling van

HDT. Dit proefschrift beoogt dan ook om zowel nieuwe HDT-kandidaten ter bestrijding van *Mav*-infecties te identificeren, als het inzicht in de onderliggende gastheer-pathogeeninteracties te verkrijgen om potentiële therapeutische targets voor de ontwikkeling van nieuwe HDT-strategieën te identificeren.

Om de doelstellingen van dit proefschrift te behalen, lag in **hoofdstuk 3** de nadruk op het ontwikkelen van gestandaardiseerde en betrouwbare celmodellen voor het bestuderen van *Mav*-infecties. Hiervoor hebben we zowel primaire humane macrofagen als de MeUuSo-cellijn gebruikt. Waar macrofagen een hoge fysiologische relevantie bij *Mav*-infectie in de gastheer hebben, biedt de cellijn de mogelijkheid om experimenten uit te voeren zonder een beperking in cel aantallen. Door verschillende parameters van *Mav*-infectie op gastheercellen te testen en de opname en eliminatie van bacteriën te evalueren, hebben we de infectiecondities voor toekomstige experimenten bepaald. Daarbij toonden we aan dat de MGIT-assay een objectieve, geautomatiseerde en valide alternatief is op de traditionele CFU-assay voor het kwantificeren van intracellulaire bacteriën. De ontwikkeling van deze infectiemodellen bood niet alleen waardevolle inzichten in de dynamiek van *Mav*-infecties aan, maar stelde ons ook in staat om de effectiviteit van potentiële HDT-kandidaten en de intracellulaire interacties tussen de gastheercel en de bacterie te bestuderen.

Om HDT-kandidaten voor *Mav*-infecties te identificeren, hebben we gekozen voor een herpositioneringsstrategie: het testen van al goedgekeurde geneesmiddelen die mogelijk de intracellulaire overleving van *Mav* kunnen remmen. Deze benadering zou het toekomstige ontwikkelingsproces kunnen versnellen doordat de veiligheid en farmacokinetiek van deze middelen al (grotendeels) bekend zijn. In **hoofdstuk 4** presenteren we onderzoeksresultaten van het medicijn amiodarone, dat momenteel wordt toegepast bij de behandeling van hartritmestoornissen. Behandeling van *Mav*-geïnfecteerde humane macrofagen met amiodarone resulteerde in een verhoogde klaring van intracellulaire *Mav*, zonder dat de bacterie direct werd gedood, wat suggereert dat amiodarone de afweermechanismen van de macrofaag versterkt. Onderzoek naar het mechanisme toonde aan dat amiodarone autofagie activeert, een proces dat essentieel is voor het opruimen van intracellulaire afvalstoffen, waaronder pathogenen zoals *Mav*. We ondervonden dat amiodarone de vorming van (auto)fagosomen bevorderde en de lokalisatie van bacteriën binnen deze compartimenten verhoogde. Daarnaast zagen we dat behandeling met amiodarone resulteerde in verhoogde nucleaire lokalisatie van transcriptiefactor EB (TFEB), die betrokken is bij de regulatie van autofagie-gerelateerde genen. Naast verminderde overleving in macrofagen, liet deze studie zien dat *Mav*-overleving ook sterk verlaagd was in amiodarone-behandelde zebrafissen, wat de potentie van amiodarone als HDT-kandidaat verder onderbouwt.

Naast amiodarone resulteerde onze screeningsaanpak ook in de identificatie van de fenothiazines trifluoperazine (TFP) en chlorprothazine (CPE), waarvan de onderzoeksresultaten worden beschreven in **hoofdstuk 5**. Deze medicijnen worden normaliter gebruikt voor de behandeling van psychische aandoeningen maar bleken eveneens de intracellulaire overleving van *Mav* in humane macrofagen te verlagen, met beperkte directe antibacteriële werking. Dit suggereert dat TFP en CPE werken door hoogstwaarschijnlijk de antibacteriële gastheercelrespons te stimuleren. Van de verschillende mechanismen die macrofagen kunnen inzetten tegen *Mav*-infectie,

konden we aantonen dat autofagie hierin geen rol speelde. TFP en CPE verhoogden wel de productie van ROS, wat bijdroeg aan een verbeterde bacteriële klaring. Van de twee belangrijkste bronnen van ROS-productie in macrofagen, de mitochondriën en NADPH oxidase, bleek laatstgenoemde gedeeltelijk bij te dragen aan de door TFP- en CPE-geïnduceerde antibacteriële activiteit van de cel. De gedeeltelijke rol van ROS suggereert dat deze fenothiazines mogelijk ook andere gastheermechanismen moduleren om de intracellulaire bestrijding van *Mav* te stimuleren. De bevindingen in hoofdstukken 4 en 5 leveren niet alleen veelbelovende HDT-kandidaten op, maar bieden ook nieuwe inzichten in de relevante mechanismen van de gastheerrespons bij de eliminatie van *Mav*, wat een belangrijke basis vormt voor de verdere ontwikkeling van veilige en effectieve HDT-strategieën.

Het tweede onderzoeksdoel van dit proefschrift was het karakteriseren van de gastheerrespons op *Mav*-infectie. Om te begrijpen welke veranderingen in genexpressie als reactie op infectie plaatsvinden, hebben we in **hoofdstuk 6** een diepgaande transcriptoomanalyse van *Mav*-geïnfekteerde humane macrofagen uitgevoerd. Gezien de bestaande kennis over de gastheerrespons bij *Mtb*, includeerden we ook *Mtb*-geïnfekteerde humane macrofagen als vergelijkingsgroep. Dit stelde ons in staat om de relevantie van bepaalde genexpressiepatronen na *Mav*-infectie beter te interpreteren. De analyse toonde substantiële overlap tussen de gastheerrespons op *Mav* en *Mtb*, waaronder de regulatie van genen die coderen voor cytokinen, bekende sleutelcomponenten van de antimicrobiële afweer. Daarnaast zagen we dat beide pathogenen genen beïnvloedden die betrokken zijn bij lipidenmetabolisme. Voor *Mtb* is bekend dat de bacterie het lipidenmetabolisme van de gastheer zodanig moduleert dat lipiden in hogere mate worden opgenomen en opgeslagen, een strategie waarmee de bacterie toegang krijgt tot deze voedingsstoffen. Onze analyse identificeerde daarnaast genen die sterker gereguleerd worden na *Mav*- dan na *Mtb*-infectie. Zo leidde *Mav*-infectie tot een sterkere expressie van cytokine-coderende genen, genen die mogelijk betrokken zijn bij apoptose, en van GIMAP-genen, waarvan de rol in mycobacteriële infecties nog grotendeels onbekend is. Deze resultaten leveren waardevolle inzichten in de gastheermechanismen die betrokken zijn bij *Mav*-infecties, en die zouden kunnen bijdragen aan de identificatie van nieuwe therapeutische targets voor HDT.

Samengevat biedt dit proefschrift nieuwe aanknopingspunten voor de ontwikkeling van HDT voor *Mav*-infecties. Enerzijds door het identificeren van veelbelovende therapeutische kandidaten die verder kunnen worden ontwikkeld, en anderzijds door het genereren van diepgaand inzicht in de gastheerrespons op *Mav*-infecties, wat kan bijdragen aan effectievere en duurzamere behandelingen met een verlaagd risico op resistentieontwikkeling.