



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Host-directed therapy for the treatment of tuberculosis: rewiring the host to recover control

Heemskerk, M.T.

Citation

Heemskerk, M. T. (2026, April 23). *Host-directed therapy for the treatment of tuberculosis: rewiring the host to recover control*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4302677>

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/1887/4302677>

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

Nederlandse Samenvatting

Tuberculose (TBC), veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), blijft een van de belangrijkste doodsoorzaken wereldwijd als gevolg van infectieziekten. De opkomst van multiresistente (MDR), extensief resistente (XDR) en volledig resistente (TDR) stammen ondermijnt verder in toenemende mate de bestrijding van *Mtb*. Het vermogen van *Mtb* om latente, metabool inactieve infecties binnen gastheercellen te vestigen, bemoeilijkt de behandeling verder aangezien conventionele antibiotica voornamelijk gericht zijn op actief replicerende bacillen, waardoor latente populaties onaangetast blijven. De standaard behandelingen vereisen zes maanden of langer met diverse medicatie, wat aanzienlijke toxiciteit en slechte therapietrouw veroorzaakt, wat op zijn beurt verdere antibioticaresistentie bevordert. Het enige goedgekeurde vaccin, Bacille Calmette-Guérin (BCG), biedt slechts gedeeltelijke en inconsistente bescherming bij volwassenen.

Mtb persisteert door manipulatie van gastheerimmuunroutes. Het kaapt de cellulaire signalering in de macrofaag, vertraagt de adaptieve immuunrespons en bevordert granuloomvorming om eliminatie te ontwijken. Deze interacties tussen gastheer en pathogeen vereisen therapieën die niet alleen het pathogeen doden, maar ook gastheerresponsen herprogrammeren om de bacteriële klaring te verbeteren.

Gastheegerichte therapie versterkt de antimicrobiële mechanismen van de gastheer door gastheer immuun reacties te veranderen die door *Mtb* worden gemanipuleerd. In tegenstelling tot antibiotica werkt gastheegerichte medicatie op gastheercellen, waardoor dit type medicatie minder gevoelig is voor ontwikkeling van bacteriële resistentie. Ze functioneren ook op latente *Mtb*, werken in synergie met antibiotica en kunnen de behandelduur verkorten. Aangezien veel gastheer signaleringsroutes geconserveerd zijn in de interactie tussen pathogeen en gastheer, heeft gastheegerichte therapie ook potentieel tegen andere intracellulaire pathogenen, zoals niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) en *Salmonella enterica* (*Stm*). Tot slot kan het hergebruiken van reeds klinisch goedgekeurde geneesmiddelen met bekende veiligheidsprofielen de ontwikkeling als gastheegerichte medicatie voor TBC aanzienlijk versnellen. Mechanistisch kunnen gastheegerichte medicatie de intrinsieke cellulaire antimicrobiële verdediging bevorderen, immuunresponsen moduleren om pathogeenklaring te verbeteren en weefselschade te minimaliseren, gastheerceldoodroutes reguleren en de epigenetische staat herprogrammeren om bactericide macrofaagfenotypes te bevorderen. Ondanks deze voordelen zijn

effectieve gastheergerichte therapieën voor TBC nog steeds beperkt, wat systematische ontdekking en validatie vereist.

In dit kader beschrijft dit proefschrift nieuwe hulpmiddelen om de ontdekking van gastheergerichte therapieën te versnellen (**Hoofdstuk 2**). Een screeningsplatform gebaseerd op flowcytometrie werd ontwikkeld om de intracellulaire bacteriële belasting in geïnfecteerde cellen snel te kunnen kwantificeren. Door fluorescent-gelabelde bacteriën te combineren met geautomatiseerde cytometrie werd de analysetijd teruggebracht van weken naar dagen in vergelijking met traditionele kolonievormende eenheid technieken. Dit platform werd aangevuld met een machine learning-model, getraind op screeningsdata en aangevuld met een openbare bioactiviteitsdatabank. Dit computationele model voorspelde actieve gastheergerichte-therapie kandidaten door verbindingen te identificeren die waarschijnlijk gastheerroutes moduleren die essentieel zijn voor intracellulaire bacteriële overleving. Gezamenlijk maken deze benaderingen de systematische ontdekking van meerdere gastheergerichte-therapie kandidaten mogelijk.

De initiële screening van 1.260 farmacologisch actieve verbindingen leverde meerdere hits op met gastheergerichte-therapie activiteit, waarbij receptor tyrosine kinase (RTK)-remmers naar voren kwamen als een belangrijke behandelbare gastheerroute (**Hoofdstuk 2**). Het machine learning-model voorspelde succesvol aanvullende effectieve RTK-remmers, met een aanzienlijk verhoogd slagingspercentage vergeleken met de initiële screening. Een onbevooroordeelde humane kinome-brede siRNA-screen bevestigde de essentiële rol van RTK-siginaaltransductie in de regulatie van intracellulaire *Mtb*-overleving. Deze bevindingen vestigen gezamenlijk RTK-siginaaltransductie als een centrale regulator in intracellulaire *Mtb*-overleving en positioneren RTK-remmers als sterke gastheergerichte-therapie kandidaten. Opvallende verbindingen zijn onder andere Dovitinib, AT9283 en ENMD-2076, die de intracellulaire *Mtb*-belasting inclusief die van MDR-stammen significant verminderen.

Vervolgens werden bestaande gastheergerichte-therapie kandidaten geoptimaliseerd om de werkzaamheid te verbeteren. De AKT1/PKB-remmer H-89, al eerder geïdentificeerd als gastheergerichte-therapie kandidaat, vertoont slechts matige activiteit tegen *Mtb*. Om effectievere analogen te vinden, werd een bibliotheek van 76 structurele analogen van H-89 getest (**Hoofdstuk 3**). Dit leidde tot de ontdekking van 97i, dat sterke activiteit vertoonde tegen antibiotica gevoelige en MDR-*Mtb*-stammen in primaire humane macrofagen en synergie vertoonde met suboptimale concentraties rifampicine. De activiteit van 97i werd bevestigd in niet-humane primaten-alveolaire macrofagen en *in vivo* in een zebrafisembryo model. Mechanistisch bevordert 97i autofagie en lysosomale activiteit, waardoor intracellulaire bacteriële degradatie

wordt versneld. In tegenstelling tot H-89 remt 97i ook kinases uit de PCTAIRE-familie, CAMK1 en PFKL, wat het gastheergerichte werkingsprofiel verbreedt. Dit werk benadrukt structuurgeleide optimalisatie als een strategie om de gastheergerichte-therapie werkzaamheid te verfijnen.

Autofagie speelt een centrale rol in de gastheerafweer tegen *Mtb*. Om dit te benutten, werd een bibliotheek van 96 autofagie-modulerende verbindingen getest, wat leidde tot de identificatie van zes potente gastheergerichte-therapie kandidaten (**Hoofdstuk 4**). Twee hiervan, de structuuranalogen Pimozide en Fluspirilene, werden in detail onderzocht. Beide geneesmiddelen bevorderen lysosomale biogenese en autofagie via nucleaire translocatie van TFEB, een meesterregulator van lysosomale en autofagie-gerelateerde genexpressie. Pimozide moduleert bovendien immuunsignalering door STAT5-fosforylatie te remmen, waardoor CISH-accumulatie op *Mtb*-fagosomen vermindert, wat vervolgens fagosomale verzuring bevordert. Het induceert ook reactieve zuurstof- en stikstofsoorten (ROS/RNS), moleculen bekend als effectief in bacteriële doding. Belangrijk is dat beide geneesmiddelen werken tegen MDR-*Mtb* en *Stm*, wat autofagie en lysosomale activatie bevestigt als belangrijke gastheermechanismen.

De autofagiescreen identificeerde ook Tamoxifen, een antikankermedicijn en selectieve oestrogenreceptormodulator (SERM). Ondanks zijn gevestigde rol als SERM, bevestigden mechanistische studies, inclusief oestrogenreceptor-knock-out mutanten en transcriptomics, dat de gastheergerichte activiteit van Tamoxifen onafhankelijk is van oestrogenreceptor-signalering (**Hoofdstuk 5**). In plaats daarvan activeert Tamoxifen TFEB, bevordert het lysosomale biogenese en verhoogt het de lokalisatie van *Mtb* in het lysosoom. Tamoxifen verminderde MDR-*Mtb* overleving in humane macrofagen en is effectief in zebrafisembryo's, wat het potentieel benadrukt voor snelle klinische toepassing via herbestemming van het geneesmiddel.

Hoewel gastheergerichte-therapie kandidaten die direct cellulaire verdedigingsprocessen stimuleren voor de hand liggende kandidaten zijn, kan herprogrammering van de macrofaag via epigenetische modulatie eveneens veelbelovend zijn. Eerst werd aangetoond dat *Mtb*-infectie histon-deacetylase (HDAC)-expressie verandert, wat wijst op een rol van HDAC's in intracellulaire *Mtb*-infectie (**Hoofdstuk 6**). Vervolgens werd aangetoond dat zowel pan-HDAC-remmers, zoals trichostatine A (TSA), als selectieve klasse IIa-HDAC-remmers, TMP195 en TMP269, de intracellulaire *Mtb*-belasting significant verminderen. HDAC-remming polariseert macrofagen naar een meer bactericide fenotype en onderdrukt de productie van ontstekingsbevorderende cytokines, wat de pathoogkilling verbetert. De

gastheegerichte-activiteit van HDAC-remming werd bevestigd in een zebra-visembryo model, waarmee HDAC's als veelbelovende HDT-doelen worden geïdentificeerd.

Ondanks hun diverse chemische structuren en primaire doelwitten, convergeerden meerdere gastheegerichte-therapie kandidaten, 97i, Pimozide, Fluspirilene en Tamoxifen, op een gemeenschappelijk mechanisme, namelijk TFEB-gemedieerde lysosomale activatie en inductie van autofagie. Dit onderstreept de rol als een centrale gastheerroute voor de controle van intracellulaire pathogenen. De pathogeen overbruggende werkzaamheid van deze verbindingen tegen *Stm* en de validatie van gastheegerichte-therapie kandidaten in primaire humane macrofagen, bronchoalveolaire lavage (BAL)-cellen van niet-humane primaten en zebra-visembryo modellen, tonen hun translationele potentieel aan. Hun werkzaamheid tegen MDR-*Mtb* en de waargenomen synergie met een conventioneel antibioticum ondersteunen verder de integratie van gastheegerichte therapie in huidige TBC-behandelingsregimes.

Dit proefschrift levert sterk preklinisch bewijs dat gastheegerichte therapie de behandeling van TBC kan verbeteren. Door te richten op gastheersignaleringsroutes die betrokken zijn bij autofagie, lysosomale activatie, RTK-sigtaaltransductie en epigenetische regulatie, versterken gastheegerichte-therapieën de bacteriële klaring, bestrijden zij antibioticaresistente stammen en kunnen zij de behandelduur verkorten. De combinatie van fenotypische screening, voorspellende machine learning gebaseerde modellen en mechanistische validatie, leverde meerdere veelbelovende gastheegerichte-therapie kandidaten op, waarvan sommige, zoals Pimozide, Fluspirilene en Tamoxifen, reeds klinisch goedgekeurd zijn, wat een versnelde klinische toepassing mogelijk maakt.

Door de afweerreactie van de gastheer gericht te versterken, bieden gastheegerichte therapieën een veelbelovende nieuwe benadering voor de behandeling van TBC en creëren zij perspectieven voor andere intracellulaire infecties.