

<http://hdl.handle.net/1765/106444>



# Nederlandse samenvatting



## SAMENVATTING VAN DE BESPREKING

Tuberculose (TBC) brengt al millennia lang een forse ziektelast met zich mee voor de mensheid en blijft dit tot op heden doen, ondanks het feit dat curatieve behandeling inmiddels beschikbaar is. Dit relatieve 'succes' van TBC kan worden verklaard door een combinatie van mycobacteriële-, gastheer- en behandelingsfactoren. Belangrijke mycobacteriële factoren die bijdragen aan deze persisterende ziektelast zijn nieuw opkomende stammen met verhoogde virulentie en de toenemende mate en ernst van antibioticaresistentie onder deze stammen. Een menselijke (gastheer) factor die een belangrijke rol speelt is de grote hoeveelheid individuen die de bacterie *Mycobacterium tuberculosis* bij zich dragen zonder hier ziek van te zijn, maar wel actieve TBC kan ontwikkelen. Een laatste belangrijke factor is de huidige (te) lange behandelduur van TBC van gemiddeld zes maanden, die noodzakelijk is om persisterende bacteriën te elimineren. Belangrijke vragen waarop TBC onderzoek zich momenteel richt, zijn:

- Hoe en waar persisteren de mycobacteriën die de behandeling van TBC zo langdurig maken?
- Hoe draagt ons eigen immuunsysteem bij aan hun voortbestaan en reactivatie?
- Hoe kunnen we persisterende subpopulaties van mycobacteriën meten?
- Hoe ontwikkelen en screenen we nieuwe middelen specifiek gericht op deze persisterende populaties?

Het werk in dit proefschrift heeft als doel om de behandeling van TBC te verbeteren door; (i) meer inzicht te krijgen in de pathofysiologie van TBC om nauwkeuriger te bepalen welke factoren van ons eigen immuunsysteem mogelijk gemoduleerd kunnen worden om behandeling te bespoedigen, en (ii) De translationele waarde van preklinische muismodellen voor TBC als screeningsinstrument voor potentiële nieuwe middelen of combinaties van middelen te optimaliseren. Hieronder volgt een samenvatting van het verrichte werk onderverdeeld in relevantie ten aanzien van mycobacteriële factoren, gastheer factoren en behandelingsfactoren.

## MYCOBACTERIËLE FACTOREN

Vorderingen in genotypering in combinatie met klinische observaties over de afgelopen twintig jaar hebben laten zien dat de verschillen tussen *M. tuberculosis* stammen die TBC veroorzaken groter zijn dan aanvankelijk werd gedacht. Deze vormen een belangrijke factor in de pathogenese van TBC. Het beste voorbeeld betreft de stammen van het Beij-

ing genotype. Beijing stammen hebben een prominente rol gespeeld bij de verspreiding van multiresistente TBC in Eurazië en zijn geassocieerd met falen van de behandeling en opvlamming van actieve TBC in patiënten in andere delen van de wereld. Het is niet moeilijk voor te stellen hoe antibioticaresistentie kan bijdragen aan het falen van de behandeling. Beijing stammen beschikken echter ook over een aantal andere unieke pathogene eigenschappen die beter in kaart gebracht moeten worden om hun klinisch succes te begrijpen. Om deze reden is de mycobacteriële factor die nader bestudeerd zal worden in dit proefschrift de variatie tussen *M. tuberculosis* stammen en hun invloed op de behandeling en pathogenese van TBC in muismodellen.

In tegenstelling tot de meeste andere *M. tuberculosis* stammen brengen stammen van het Beijing genotype ook onder normale omstandigheden een groep eiwitten tot expressie die behoren tot het DosR regulon. Dit bestaat uit circa 50 genen die onder controle staan van de DosR transcriptie factor. Dit regulon is een belangrijke virulentiefactor voor *M. tuberculosis*, omdat een essentiële rol speelt in de mycobacteriële overgang naar een persisterende staat onder invloed van hypoxie. Aangezien mycobacteriën in deze persisterende staat beter bestand zijn tegen antibiotica kan de expressie van het DosR regulon onder niet-hypoxische condities een mogelijke verklaring zijn voor het verschil in behandeluitkomst tussen Beijing stammen en andere stammen.

Preklinische muismodellen voor TBC die behandeluitkomst meten gebruiken vaak *M. tuberculosis* stammen als H37Rv en Erdmann. Deze stammen waren klinisch relevant ten tijde van hun isolatie meer dan honderd jaar geleden, maar worden tegenwoordig niet meer geïsoleerd uit patiënten. Om deze reden was ons specifieke doel in **Hoofdstuk 5** om uit te zoeken wat het effect was op de behandeluitkomst van het gebruik van een Beijing stam in ons muismodel om op deze manier de translationele waarde van ons proefdiermodel te verhogen.

Onze evaluatie van behandeluitkomsten in muizen geïnfecteerd met de Beijing-1585 stam liet zien dat geen van de tien geteste combinaties van antibiotica, inclusief de huidige standaardbehandeling van TBC bestaande uit 2RZH/4RH (twee maanden rifampicine-pyrazinamide-isoniazide gevolgd door vier maanden rifampicine-isoniazide), 100% genezing kon bewerkstelligen. Dit is interessant, omdat ten minste vier eerdere vergelijkbare studies waarin de H37Rv stam werd gebruikt 100% genezing liet zien van 2RHZ/2RH in BALB/c muizen, waaronder één studie met H37Rv in ons eigen muismodel voor TBC. Dit geeft aan dat het succespercentage van behandeling in muismodellen waarin H37Rv wordt gebruikt mogelijk overschat wordt. Op basis hiervan lijkt het er dus op dat het gebruik van stammen die recent uit patiënten zijn geïsoleerd, zoals Beij-

ing-1585, in plaats van een laboratoriumstam zoals H37Rv de translationele waarde van preklinisch muismodellen voor TBC kan verbeteren.

Een andere belangrijke eigenschap van Beijing stammen betreft hun virulentie. Infectie met virulente Beijing stammen resulteert in hogere aantallen mycobacteriën, meer schade aan de longen en verhoogde mortaliteit in vergelijking met andere stammen en niet-virulente Beijing stammen. Eerdere studies in ons muismodel voor TBC bevestigden deze virulentie voor Beijing-1585, maar ook voor EAI-1627, een ander klinisch isolaat dat veel voorkomt in Zuidoost-Azië en toebehoort aan het 'East-African/Indian' genotype. Dit eerdere evidente verschil in virulentie tussen recent geïsoleerde klinische stammen in vergelijking met H37Rv inspireerde ons om de immunologische reactie op elk van deze stammen nader te onderzoeken. De resultaten beschreven in **Hoofdstuk 3** laten zien dat de immuunreactie uitgelokt door H37Rv overeen komt met het huidige paradigma van TBC pathogenese, gekarakteriseerd door een IL-12 / T-Helper 1 / Interferon (IFN)- $\gamma$  reactie in de longen zoals uitgelegd in **Figuur 1** en **Box 1** in **Hoofdstuk 2**. De immuunreactie tegen Beijing-1585 en EAI-1627 bleken echter geassocieerd met een toename van B-cellen in plaats van T-cellen in de longen op het hoogtepunt van infectie. Myeloïde cellen waren in vergelijkbare frequenties aanwezig bij Beijing-1585 en EAI-1627 in vergelijking met H37Rv, maar leken minder functioneel met lage expressie van iNOS en IL-12. Daarnaast vonden we in het beenmerg van muizen geïnfecteerd met Beijing-1585 en EAI-1627 verminderde expressie van IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en IFN- $\beta$ , cytokines die essentieel zijn voor de ontwikkeling van myeloïde cellen. Dit was al meetbaar vanaf de derde dag na infectie, voordat andere systemische effecten gedetecteerd konden worden. Deze combinatie van myeloïde cellen in de longen die waarschijnlijk vermindert functioneel zijn, in combinatie met de verminderde expressie in het beenmerg van cytokines essentieel voor de ontwikkeling van cellen met een bactericide fenotype is suggestief voor een eerder niet beschreven belangrijke rol van deze processen in stamgerelateerde virulentie in TBC.

In **Hoofdstuk 2, Figuur 3** wordt een gedetailleerde hypothese beschreven over de invloed van cytokines op de ontwikkeling van myeloïde cellen. Interleukine (IL)-12, wat aanwezig is in de longen tijdens infectie met H37Rv, maar niet bij Beijing-1585 of EAI-1627 infectie, zou systemisch kunnen zorgen voor een IFN- $\gamma$ -gemedieerde ontwikkeling van myeloïde cellen met een fenotype dat excessieve inflammatoire schade door het aangeboren immuunsysteem in de longen voorkomt, maar het adaptieve immuunsysteem stimuleert. Een andere bevinding beschreven in **Hoofdstuk 3** betreft de rol van type 1 interferon in de pathogenese van TBC tijdens acute infectie. Eerdere studies in een ander muismodel voor TBC speculeerden dat toegenomen type 1 interferon signalering een bijdrage leverde aan de verhoogde virulentie van Beijing stammen in

vergelijking met H37Rv. In die studies werd er gevonden dat de Beijing HN878 stam een hoger IFN- $\alpha$  mRNA expressie-niveau induceerde in de long, wat geassocieerd was met lagere inductie van IL-12 en TNF- $\alpha$  en verminderde T-cel activatie in vergelijking met H37Rv. Wij vonden ook lagere inductie van IL-12 voor Beijing-1585, maar konden dit niet associëren met verhoogde type 1 interferon activiteit. Onze conclusie was gebaseerd op directe meting van IFN- $\alpha$  en IFN- $\beta$  expressie, vergelijkbaar met de eerdere studie, maar verder versterkt door metingen van drie type 1 interferon-geïnduceerde genen.

Samengevat pleiten onze bevindingen uit **Hoofdstuk 5** over de invloed van *M. tuberculosis* stamverschillen op de uitkomst van behandeling en onze bevindingen uit **Hoofdstuk 3** over de invloed van stamverschillen op de immunoreactie tijdens acute infectie ervoor dat klinische mycobacteriële stammen in preklinische muismodellen gebruikt moeten worden. Dit kan de translationele waarde van deze modellen verbeteren en onze basale kennis over de immunorespons tegen TBC uitbreiden. Een belangrijk gegeven bij dit laatste punt betreft dat veel van onze fundamentele kennis over de immunoreactie in TBC gebaseerd is op experimentele data van muisstudies die H37Rv gebruikten, terwijl wij laten zien dat de gemeten uitkomsten voor H37Rv niet representatief zijn voor de immunoreactie tegen stammen die op dit moment TBC veroorzaken in patiënten.

## GASTHEER FACTOREN

Onze bevindingen zoals beschreven in **Hoofdstuk 3** lieten een verschil zien in de regulatie van IL-12 tussen H37Rv en de klinische stammen. Daarnaast vonden we ook verschillen in B-cellen, IL-4 en de type 1 interferon respons die niet goed passen binnen het huidige IL-12 / T-helper (Th) 1 / IFN- $\gamma$  paradigma, maar wel van belang kunnen zijn in TBC pathogenese. Redenen om te geloven dat immunologische reacties naast Th1 immuniteit van belang zijn komen voort uit (i) onbevredigende resultaten van vaccinatie studies gericht op het stimuleren van Th1-immuniteit, (ii) verhoogde inflammatoire schade geassocieerd met interventies leidend tot toegenomen IFN- $\gamma$  productie door T-cellen in de longen van *M. tuberculosis*-geïnfecteerde muizen en (iii) de toename van ziektelast geassocieerd met het blokkeren van systemen die de effectiviteit van Th-1 immuniteit remmen in muizen. Om deze redenen was het doel in **Hoofdstuk 2** om de inzichten in de rollen van B-cellen, IL-17 en type 1 interferon beter te integreren in ons huidige begrip van TBC pathogenese. De belangrijkste hypothese die we hierbij hebben gevormd is dat de type 1 interferon respons, IL-17 en hun interactie convergeren en leiden tot een stimulerend effect op B-cellen door: (i) de inductie van B-cell activating factor (BAFF), (ii) stimulatie van vorming en functie van tertiaire lymfoïde structuren

(TLS) en (iii) stimulatie van Th17.1 cellen die door hun hoog inflammatoire karakter sterk pathogeen kunnen zijn. (**Hoofdstuk 2**, Fig. 5).

Type 1 interferonen worden over het algemeen beschouwd als negatieve regulators in TBC pathogenese, omdat: (i) ze een regulator fenotype induceren in myeloïde cellen, waardoor intracellulaire mycobacteriën in deze cellen eerder persisteren dan geëlimineerd worden, (ii) er beschreven is dat virulente stammen type 1 interferonen sterker induceren en (iii) dat een interferon genexpressie handtekening in RNA geïsoleerd uit perifere bloedcellen correleert met actieve TBC. Gebaseerd op ons literatuurreview zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** kan er geconcludeerd worden dat de effecten van type 1 interferon divers zijn en sterk afhankelijk van de ontwikkeling van myeloïde cellen onder invloed van IFN- $\gamma$ , M-CSF en/of GM-CSF voorafgaand aan het contact met type 1 interferon (**Hoofdstuk 2**, Fig. 3). De belangrijkste overweging is dat ontwikkeling onder invloed van IFN- $\gamma$  essentieel is voor het induceren van een regulator fenotype van myeloïde cellen door type 1 interferon. Dit wordt ondersteund door twee studies waarvan de resultaten laten zien dat type 1 interferonen juist een beschermend effect hebben in de acute fase van *M. tuberculosis* infectie in de afwezigheid van IFN- $\gamma$  in muismodellen voor TBC. Een tweede overweging is dat type 1 interferonen alleen een regulator fenotype kunnen induceren in myeloïde cellen die gedifferentieerd zijn onder invloed van M-CSF, omdat GM-CSF myeloïde cellen minder gevoelig maakt voor type 1 interferon. Dit kan een mogelijke verklaring zijn voor het feit dat de effecten van type 1 interferonen vooral gezien worden tijdens acute infectie, maar afnemen als de infectie doorzet en de systemische hoeveelheid GM-CSF toeneemt. Ten slotte kunnen IFN- $\alpha$  en IFN- $\beta$  een verschillend effect bewerkstelligen waarbij IFN- $\alpha$  voornamelijk pro-inflammatoir lijkt te werken en IFN- $\beta$  juist regulator (**Hoofdstuk 2**, box 4 & **Hoofdstuk 3**).

De rol van B-cellen in TB pathogenese is de laatste decennia naar de achtergrond verdrongen door de aangetoonde centrale rol van T-cellen, maar heeft de afgelopen jaren hernieuwde aandacht ontvangen. In patiënten is aangetoond dat antilichaam-gemedieerde immuniteit een actieve rol speelt in TBC en dat patiënten met actieve TBC over lagere aantallen, dysfunctionele B-cellen beschikken. Deze bevindingen suggereren dat B-cellen een beschermend effect hebben tijdens chronische TBC infectie in patiënten. In ons muismodel van TBC in **Hoofdstuk 3** zien we echter dat acute infectie met Beijing-1585 en EAI-1627 geassocieerd is met hogere aantallen B-cellen en IL-4 eiwit levels in de longen in vergelijking met de minder virulente H37Rv. Deze ogenschijnlijke discrepantie tussen humane en muisbevindingen suggereert dat B-cellen beschermend zijn tijdens chronische TBC, maar eventueel bij kunnen dragen aan de ernst van de ziekte tijdens acute infectie.

Het belang van een verbeterd begrip van TBC pathogenese is benadrukt door de centrale rol die ons eigen afweersysteem speelt in de behandeling van TBC. Het is een effectieve en efficiënte eerste barrière, gezien het feit dat 'slechts' 5-15% van alle niet immuun-gecompromitteerde patiënten geïnfecteerd met *M. tuberculosis* daadwerkelijk actieve TBC ontwikkelt. Echter, op het moment dat deze barrière geen stand houdt en een actieve TBC zich ontwikkelt zal 50-70% van de patiënten binnen twee jaar overlijden als zij geen behandeling krijgen. Paradoxaal kan dezelfde granulomateuze afweerreactie en de intracellulaire verblijfplaats van mycobacteriën in macrofagen en andere myeloïde cellen juist bescherming bieden tegen antibiotica en mycobacteriën ondersteunen hun ontwikkeling tot een persisterend fenotype. Om deze reden kan de ziekte in het geval van TBC niet los gezien worden van de gastheer. Deze essentiële rol van ons eigen afweersysteem in de pathogenese van TB geeft het belang aan van het integreren van gastheerfactoren in de ontwikkeling van nieuwe behandelopties.

In de studie beschreven in **Hoofdstuk 4** onderzoeken we of het moduleren van ons eigen afweersysteem, naast het toedienen van antibiotica, kan leiden tot betere behandeluitkomsten in ons muismodel voor TBC. Immunotherapie in TBC kan bestaan uit strategieën gericht op het verbeteren van de capaciteit van myeloïde cellen om intracellulaire mycobacteriën te doden. Onze strategie was gebaseerd op de hypothese dat immunotherapie opgebouwd uit all-trans retinoïc acid,  $\alpha$ -galactosylceramide en 1,25 dihydroxyvitamine D de ontwikkeling van myeloïde cellen stuurt naar een bactericide fenotype in plaats van een regulatorisch fenotype. Muizen werden geïnfecteerd met *M. tuberculosis* H37Rv en behandeld met isoniazide, rifampicine en pyrazinamide (RHZ) of een combinatie van RHZ met immunotherapie. De resultaten laten zien dat RHZ in combinatie met immunotherapie leidt tot significant minder opvlamming van ziekte na 12 weken behandeling in vergelijking met alleen RHZ (**Hoofdstuk 4, Fig. 3**). De belangrijkste conclusie die hieruit getrokken kan worden is dat adjuvante immunotherapie gericht op het verhogen van de effectorfunctie van myeloïde cellen kan helpen in de specifieke eliminatie van persisterende mycobacteriën die opvlamming van ziekte op een later moment kunnen veroorzaken.

## BEHANDELINGSFACTOREN

Klinische implementatie van nieuwe behandelopties, zoals immunotherapie of nieuwe antibiotica die goede resultaten hebben laten zien in preklinische studies is een langdurig en kostbaar proces. In de context van TBC heeft de negatieve uitkomst van de REMox studie uit 2014 ons een belangrijke les geleerd: vroege surrogaat eindpunten gebaseerd op bactericide activiteit of de aanwezigheid van mycobacteriën in het sputum zoals



gemeten in klinische fase IIa/b studies zijn onbetrouwbare voorspellers voor de uiteindelijke behandeluitkomst. In andere woorden: de capaciteit van (nieuwe) middelen om actief delende mycobacteriën te doden zoals aanwezig in de eerste fase van infectie en behandeling garandeert geen effectiviteit tegen persisterende mycobacteriën zoals aanwezig in de tweede fase van behandeling. Klinische fase III studies zijn duur, afhankelijk van grote groepen patiënten en kunnen wel 10 jaar duren van het ontwerpen van de studie tot het publiceren van de resultaten. Om deze reden moeten deze klinische studies gebaseerd zijn op preklinisch onderzoek met maximale translationele waarde. Voor de REMox studie waren de resultaten van de preklinische studies in muismodellen mogelijk te optimistisch geïnterpreteerd. De noodzaak blijft om deze reden aanwezig om de huidige preklinische modellen verder te optimaliseren om hun voorspellende waarde voor behandeluitkomst in klinische studies te verbeteren.

Met dit specifieke doel voor ogen hebben wij een deel van het onderzoek uit dit proefschrift verricht als onderdeel van het PreDiCT-TB consortium. Dit bestaat uit 19 publieke en private wetenschappelijke partners binnen de Europese Unie. Het doel van PreDiCT-TB is het genereren van een geïntegreerd en gevalideerd preklinisch traject voor nieuwe behandelopties voor TBC. Dit wordt bereikt door huidige en nieuwe antibiotica in meerdere *in vitro* en *in vivo* preklinische modellen te valideren tegen uitkomsten van klinische studies. Onze bijdrage bestond uit de evaluatie van diverse behandelmethoden in het Beijing-1585-geïnfecteerde BALB/c muismodel voor TBC. Een algemeen punt van kritiek op het BALB/c muismodel is het feit dat de granulomen die gevormd worden in de longen geen necrotische kern bevatten. Deze necrotische, of verkazende, kern lijkt in humane TBC een belangrijke rol te spelen, omdat het mycobacteriën kan beschermen tegen antibiotica, omdat het de weefselpenetratie beïnvloedt en kan fluctueren in mate van hypoxie en pH. De klinische relevantie van deze laesies kan het beste worden geïllustreerd door de huidige toename van chirurgische resectie hiervan in patiënten met refractaire ziekte. De afwezigheid van necrotische granulomen is de belangrijkste reden geweest voor het testen van behandeling in cavia's in plaats van muizen en de ontwikkeling van het C3HeB/FeJ muismodel voor TBC, waarin zulke laesies zich wel vormen. Echter laten andere studies zien dat de behandeluitkomst in modellen met of zonder necrotische granulomen identiek was. Ook de Ph-afhankelijke antibiotica pyrazinamide moet vermeld worden dat de mate van weefselpenetratie identiek was voor BALB/c en C3HeB/FeJ muizen. Ten slotte wijzen onder andere onze eigen studies uit dat, ondanks de aanwezige limitaties van het BALB/c muismodel voor TBC, er nog steeds sprake is van persisterende subpopulaties van mycobacteriën en dat de behandeluitkomsten vergelijkbaar zijn met humane studies. Dit blijkt ook uit de resultaten beschreven in **Hoofdstuk 5** waarin de combinatie RZHE een succespercentage had van 90% vergeleken met

de gevonden 92% in de REMox studie. Concluderend kan er dus gesteld worden dat het BALB/c muismodel, ondanks zijn limitaties, een bruikbaar preklinisch TBC model is.

Een andere belangrijke bevinding beschreven in **Hoofdstuk 5** was dat bactericide activiteit tijdens de eerste fase van behandeling niet voorspellend was voor behandeluitkomst, net zoals eerder is besproken voor klinische TBC studies. Daarnaast zijn de huidige methoden die gebruikt worden om verschillende regimes met elkaar te vergelijken gebaseerd op relatief simpele Chi-square testen tussen grote groepen muizen na een vooraf bepaalde behandelduur. Op deze manier kan er gekeken worden naar verschillen in behandeluitkomst na één specifieke behandelduur, maar kan er geen correlatie gemaakt worden tussen behandelduur en behandeluitkomst. Deze correlatie is juist nodig om nauwkeurig in te schatten met welke mate een nieuw getest regime de behandelduur eventueel kan verkorten. Om deze reden was het doel van de studie beschreven in **Hoofdstuk 6** om de huidige methoden van evaluatie van behandeluitkomst te verbeteren. In deze studie hebben we de behandeluitkomst bepaald in  $n=3$  muizen na 9 verschillende behandelduren en combineerden dit met modelgebaseerde analyses om een methode te ontwikkelen waarin de relatie tussen behandelduur en voorspelde kans op genezing accuraat voorspeld kon worden. Implementatie van deze methode stelde ons in staat om aan te tonen dat de behandeling met rifapentine-pyrazinamide-isoniazide-ethambutol (RpZHE) en rifampicine-pyrazinamide-moxifloxacin-ethambutol (RZME) effectiever is in vergelijking met rifampicine-pyrazinamide-moxifloxacin-isoniazide (RZMH). Dit verschil kon niet aangetoond worden op basis van alleen de observationele data. Deze uitkomsten waren vergelijkbaar met trends geobserveerd in andere muismodellen voor TBC en wekken de suggestie dat isoniazide een negatief effect heeft op de effectiviteit van RZM in muismodellen. Helaas bleek de translationele waarde van onze nieuwe methode voor RZME en RZMH beperkt in vergelijking met de humane data na vier maanden behandeling (97% genezing in muizen versus 80% in mensen voor RZME en 29% in muizen versus 85% in mensen voor RZMH). Deze discrepantie tussen data afkomstig van humane studies en muisstudies geeft aan dat de translationele waarde van ons muismodel voor TBC nog verder moet worden verbeterd. Een recente studie laat zien dat correctie voor additionele factoren, waaronder geavanceerde farmacokinetische factoren en farmacodynamische modelering, soort-specifieke eiwitbinding en pathologie de translationele waarde van het BALB/c muismodel voor TBC verder verbetert. Correctie voor deze factoren in combinatie met onze beschreven methodologie en integratie van mycobacteriële stamverschillen in het BALB/c muismodel voor TBC zal de translationele waarde van dit model ongetwijfeld verbeteren zodat er nauwkeuriger en efficiënter gezocht kan worden naar nieuwe regimes die geïncorporeerd kunnen worden in toekomstige klinische onderzoeken.