

# Ontwikkelingen in tuberculoseonderzoek

## De rol van zebrafissen en nieuwe genetische technieken

Doortje Heemskerk, Coen Kuijl, Wilbert Bitter

### Samenvatting

Hoewel er in de afgelopen jaren enkele nieuwe middelen voor de behandeling van tuberculose (tbc) en meer sensitieve diagnostiek van tbc zijn bijgekomen, zijn er nog steeds belangrijke stappen te nemen. Gelukkig zijn er veel interessante bevindingen uit fundamenteel en toegepast onderzoek, op het gebied van pathogenese, diagnostiek en behandeling, die uiteindelijk moeten leiden tot het stoppen van deze voortdurende pandemie. In het Amsterdam UMC wordt veel onderzoek gedaan naar potentieel nieuwe middelen, gebruikmakend van het relatief jonge zebrafisemodel. Gentechnieken, zoals het recent ontwikkelde CRISPR/Cas9 en CRISPRi leveren een enorme winst in tijd en kosten op in de studie naar zowel pathoogeen als gastheer. De impact van deze vernieuwingen op het onderzoek naar tbc en daarmee de zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen wordt in dit artikel uiteengezet.

### Abstract

Although we do have some new antimycobacterial drugs and new, more sensitive diagnostics, new findings from fundamental and applied research are urgently required to aid in the combat of this ongoing pandemic. Fortunately, promising new developments in fundamental and applied research may lead to improvements in diagnosis and treatment and our understanding of pathogenesis, and ultimately the end of the tuberculosis pandemic. The mycobacterial research unit in the Amsterdam UMC has focused on the identification of new potential antimycobacterial targets, using the relatively recent zebrafish model. Genetic techniques, such as the recently developed CRISPR/Cas9 and CRISPRi are a major advance in host and pathogen research. Moreover, this zebrafish model and these new genetic techniques can be combined to form a very powerful research tool. The impact of these novelties in tuberculosis research and drug discovery will be discussed in the following article.

### Introductie

*“Geen onaangenamer onderzoek voor den microbioloog dan die van den tuberkelbacil. De herkomst omslachtig, vaak onzeker; de vindplaats weezinwekkend, tot medelijden stemmend; de algemeenheid schrikbarend; de biologische eigenschappen niet leerrijk, de vorm gewoon, de afmetingen tegelijk te klein en te groot om interessant te zijn, de systematische verwantschap twijfelachtig, de groei traag, de cultuur moeilijk en langzaam; de somtijds noodzakelijke proeven op dieren uit hun aard treurig, en, geheel ten onrechte, door een deel van het publiek afgekeurd en veracht; de therapie, trots reusachtig onderzoek onvolkomen, en vol teleurstelling voor de beste navorschers.”* (M.W. Beijerinck, Het Gulden Boek voor de Tuberculeuse kinderen, 1908)

Hoe kijkt de microbioloog, nu de arts-microbioloog, ruim een eeuw later, naar de studie van *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*? Er zijn nog altijd grote lacunes in de bestrijding van tuberculose (tbc): een goed werkend vaccin ontbreekt, in de laatste 60 jaar is er slechts een beperkt aantal nieuwe therapeutische middelen bijgekomen - de sensitiviteit van diagnostiek laat nog steeds te wensen over en het is lastig te voorspellen welke 5 tot 10 procent van de (latent) geïnfecteerde patiënten een actieve infectie zal ontwikkelen. In dit overzichtsartikel beschrijven wij een aantal belangrijke ontwikkelingen die een optimistischer beeld geven van het fundamentele onderzoek naar tbc, en het belang daarvan voor de pijlers van bestrijding: vaccinatie, diagnostiek en behandeling.

Amsterdam UMC, afdeling Medische Microbiologie en Infectie Preventie, locatie AMC, dr. A.D. Heemskerk, aios medische microbiologie; locatie VU Medisch Centrum, dr. C. Kuijl, prof. dr. W. Bitter, die tevens verbonden is aan de afdeling Moleculaire Microbiologie, Amsterdam Institute of Molecular and Life Sciences (AIMMS), Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam. Correspondentieadres: dr. A.D. Heemskerk (a.heemskerk@amsterdamumc.nl).

### Diermodellen in tuberculoseonderzoek

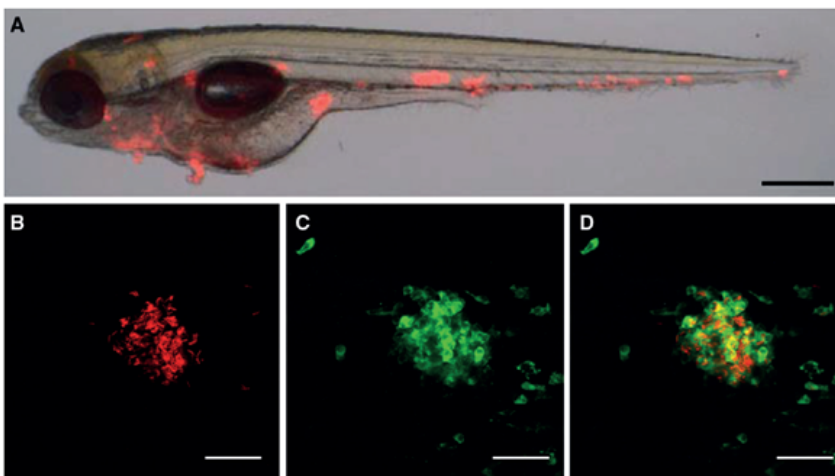
Hoe 'treurig' ook, diermodellen hebben een essentiële bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van diagnostiek, vaccins en geneesmiddelen. Hoewel muizen vaak het favoriete diermodel zijn - gezien de relatief lage kosten en overeenkomstige immunologie aan de mens - is het nadeel bij tbc-onderzoek dat de meeste muizen geen typische kenmerken vertonen zoals granuloomvorming en necrose, in tegenstelling tot cavia's en konijnen [1]. Ter illustratie: aan het begin van de twintigste eeuw werden diagnostische kweken op *Mtb* gedaan bij cavia's, door het specimen (sputum, pus, urine of lumbaalvocht) subcutaan in te spuiten en af te wachten of het kenmerkende ziekteverloop zou optreden. Aangezien dit veel tijd in beslag nam, heeft Charlotte Ruys in 1938 deze kweekmethode vergeleken met die op de recent ontwikkelde vaste voedingsbodems van Löwenstein en Jensen. Zij concludeerde dat de caviakweek wel iets sensitiever en specifiek was, maar dat het wenselijk was beide methoden in te zetten om sneller tot een diagnostische conclusie te komen [2]. Cavia's en konijnen hebben dus wel een pathofysiologie die overeenkomt met die van mensen, maar zijn duurder en er zijn minder immunologische reagentia aanwezig om deze respons goed te bestuderen [1]. Niet-humane primaten, zoals de makaak, zijn immunologisch het meest verwant aan de mens en het gebruik ervan heeft geleid tot belangrijke doorbraken in tbc-onderzoek; infectie bij deze dieren kan gedetailleerd gevolgd worden met PET/CT. Hieruit is gebleken dat progressie van tuberculose een zeer variabel beloop heeft, waarbij de

lokale immuunrespons doorslaggevend is voor het ziekteproces [3]. Ook blijkt uit onderzoek bij makaken dat mucosale bcg-vaccinatie een veel betere bescherming geeft tegen tbc dan de gebruikelijke intradermale vaccinatie [4]. Het gebruik van makaken is echter ethisch bezwaarlijk en ook zeer kostbaar. Dierproeven worden nog steeds door een deel van de bevolking veracht en kosten daarbij veel tijd vanwege de langzame groei van *Mtb*. Er is dus behoefte aan een aanvullend model dat snel, goedkoop, flexibel, ethisch verantwoord en immunologisch valide is.

### Zebravissen als diermodel

Sinds begin van deze eeuw zijn zebravissen (*Danio rerio*) succesvol gebleken als diermodel in de studie naar infectieziekten. Ondanks de afwezigheid van longen en de koudbloedige constitutie van de vis, is tbc een ziekte die hierin goed onderzocht kan worden [5]. Infectie met *Mtb* leidt niet tot ziekte bij koudbloedige dieren, maar infectie met *Mycobacterium marinum* (*Mmar*) veroorzaakt een systemische op tbc lijkende ziekte bij zebravissen [6] (figuur 1).

Zebravissen reproduceren snel (tot wel 300 eitjes per week), zijn in grote hoeveelheden te onderhouden en in het larvestadium zijn ze transparant. Dat maakt dat gastheer-pathogeeninteracties in vivo te volgen zijn. In de eerste weken van de ontwikkeling hebben zebravissen alleen een aangeboren afweersysteem. Het adaptieve immuunsysteem ontwikkelt zich later, zodat beide systemen apart van elkaar bestudeerd kunnen worden [7]. Alle componenten van het aangeboren en adaptieve immuunsysteem van de



**Figuur 1.** Vroege granuloomvorming in zebravisslarven (met toestemming overgenomen uit ref. 6).

A. Zebravisslarve geïnfecteerd met rood fluorescerende *Mmar* vijf dagen na infectie. B-D. Hogere vergroting van beginnende granulomen. B. *Mmar* in rood. C. Fagocyten (L-plastine gelabeld) in groen. D. Samengevoegde beelden om colocalisatie van bacteriën met fagocyten te tonen. (Schaal: witte streep = 35µm).

mens zijn aanwezig in het genoom van de zebravis (7). Van ongeveer 70 procent van alle humane genen is een ortholoog in de zebravis aanwezig [8]. Een groeiende beschikbaarheid van transgene lijnen en het gebruik van knockdownvarianten met behulp van CRISPR/Cas9-technieken maken het een enorm flexibel model waarbij cellulaire processen in detail in beeld gebracht kunnen worden [9].

### *Mycobacterium marinum* als modelpathogeen

*Mmar* is genetisch zeer verwant aan *Mtb*; beide bacteriën delen 3.000 orthologen, hebben overeenkomstige virulentiemechanismen en beide zijn voornamelijk terug te vinden in geïnfecteerde macrofagen [10]. Tevens veroorzaakt *Mmar* ziekte bij de mens, maar gezien de voorkeurstemperatuur van 30 tot 33°C, blijven de granulomateuze laesies beperkt tot de huid. Dit geeft dan aanleiding tot aquarium- of zwembadgranuloom. Bij immuungecompromitteerde patiënten (die met name TNF $\alpha$ -remmers en steroïden gebruiken) zijn gedissemineerde infecties gerapporteerd, met granuloomvorming in verschillende orgaansystemen, radiologisch en histo-pathologisch vergelijkbaar met (extra pulmonale) tbc [11]. Gezien het ziektebeeld bij vissen en de overleving in (humane) macrofagen lijkt de temperatuur de voornaamste reden waarom *Mmar* geen groter probleem vormt. Een groot voordeel is de tijdwinst die het gebruik van *Mmar* als pathogeen oplevert. Dankzij de *Mmar*-varianten die fluorescerende eiwitten tot expressie brengen, zijn infecties met *Mmar* (verdubbelingstijd 4 tot 6 uur ten opzichte van 20 tot 24 uur voor *Mtb*) bij de zebravislarve al na enkele dagen zichtbaar [6]. Mycobacteriën kunnen in verschillende stadia en via meerdere routes geïnjecteerd worden (6). Door gebruik te maken van specifieke mutanten kunnen zebravissen ook latent geïnfecteerd raken [12].

## Onderzoek naar tuberculose bij zebravissen

Wat heeft het zebravismodel ons geleerd over tbc?

### *Fagosoomescape*

Met behulp van het *Mmar*-zebravismodel zijn de afgelopen decennia nieuwe gastheer-pathogeen-interacties ontrafeld. De eerste was al meteen spectaculair; vrij snel werd aangetoond dat *Mmar* na opname in de macrofaag op den duur ontsnapt aan het fagosoom binnen in de macrofaag en hiermee dus ontkomt aan intracellulaire doding [13]. Dit was nieuw

en aanleiding voor tbc-onderzoekers om het model niet serieus te nemen. Enkele jaren later liet Nicole van der Wel echter zien dat ook *Mtb* ontsnapt, zij het iets later in de infectiecyclus, waardoor een dogma in het tbc-veld omver werd geworpen [14]. In beide bacteriën was hiervoor hetzelfde eiwitsecretiesysteem nodig, dat nu bekend is onder de naam ESX-1 [14]. Dit systeem ontbreekt in het tuberculosevaccin BCG en is deels verantwoordelijk voor de attenuatie [15].

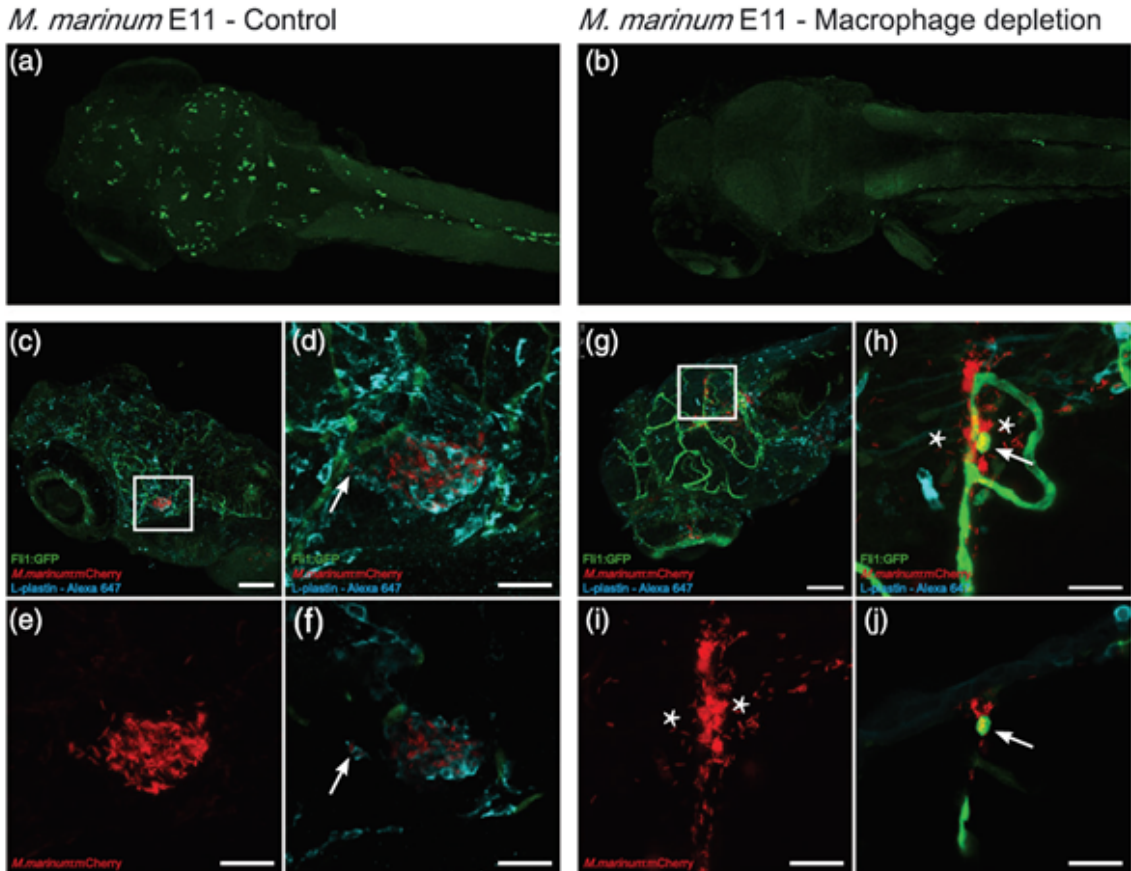
### *Granuloomvorming*

De formatie van granulomen, het kenmerk van tbc, kan door visualisatie op celniveau in de zebravis gedetailleerd in kaart gebracht worden. Zo blijkt granuloomvorming een zeer dynamisch proces te zijn dat mede wordt gedreven door virulentiefactoren van de mycobacterie, waaronder het ESX-1-secretiesysteem. Virulentiefactoren van het ESX-1-systeem interageren met gastheer matrix-metallo-proteïnase9 (MMP9) en zijn zo van invloed op granuloomvorming [16]. Granuloomvorming komt al snel na de infectie op gang, zelfs in zebravislarven die nog geen adaptief immuunsysteem hebben. Initiële granuloomvorming is dus niet afhankelijk van T-cellen, zoals lang gedacht werd. Granulomen dienen om mycobacteriën in te kapselen en verdere verspreiding te voorkomen. Ze vormen ook een proliferatieniche voor bacteriën. Bij zebravissen is aangetoond dat vooral in de vroege fase van granuloomvorming het aangeboren immuunsysteem door mycobacteriën geëxploiteerd wordt voor verdere verspreiding [17].

### *Mycobacteriële passage van de bloed-hersenbarrière*

Tuberculeuze meningitis is de dodelijkste vorm van tbc. Bij zebravissen kan *Mmar* ook het centraal zenuwstelsel infecteren [18]. In Amsterdam is in beeld gebracht dat mycobacteriën via diverse routes de bloed-hersenbarrière kunnen passeren: meeliftend in macrofagen ('Trojan horse'-methode) of als vrije bacteriën via opname en groei in endotheelcellen. Opvallend was dat in afwezigheid van macrofagen 'vrije' passage via de endotheelcellen afhankelijk was van opnieuw een functioneel ESX-1-secretiesysteem. Deze vrije passage ging gepaard met vasculitis (zie figuur 2) [19]. Vasculitis is een kenmerkend pathologisch verschijnsel bij tbc-meningitis bij mensen en ligt ten grondslag aan de intracraniale pathologie en morbiditeit van de ziekte [20].

**Figuur 2.** Mycobacteriële passage van de bloed-hersenbarriere (met toestemming overgenomen uit ref. 19). Wildtype *M. marinum* kan nog steeds hersenweefsel infecteren bij afwezigheid van macrofagen.



Het linkerpaneel laat onbehandelde zebrafislarve zien (controle) en het rechterpaneel laat behandelde zebrafislarve zien, waarbij de macrofagen zijn uitgedund.

(a) Controlelarve 5 dpf, waarbij macrofagen in groen te zien zijn (anti-L-plastine gelabeld). (b) Behandelde larve 5 dpf, waarbij macrofagen uitgedund zijn. (c) Dorsale opname van een Fli1:GFP-larve, dit is een transgene lijn waarbij de vasculatuur groen fluorescerend is, op 5 dpi, met *M. marinum* (rood) en macrofagen in blauw (anti-L-plastine gelabeld). Hier is vroege granuloomvorming zichtbaar. (d) Uitvergroting van witte vak in (c), om lokalisatie van *M. marinum* en macrofagen preciezer in beeld te brengen. (e) Corresponderend rood fluorescent kanaal om distributie van *M. marinum* te zien. (f) In aanwezigheid van macrofagen verlaat *M. marinum* (rood gekleurd) het bloedvat (groen) in fagocyten (blauw) (aan pijlpunt is een losse macrofaag zichtbaar) en vormt vroege granulomen in hersenweefsel. Schaal afbeelding c = 100  $\mu\text{m}$ , schaal afbeelding d t/m f = 25  $\mu\text{m}$ . (g) Dorsale opname van macrofagen (in blauw, anti-L-plastine gelabeld) gedepleteerde Fli1:GFP larve, na systemische infectie met *M. marinum* (rood). Het wit-omkaderde gebied is uitvergroot in afbeelding h, i en j. (h). In afwezigheid van fagocyterende cellen zijn er mycobacteriën zichtbaar buiten de bloedvaten. Er is een suggestie dat mycobacteriën zich in endotheelcellen bevinden (\*). (i) Corresponderende rode kanaal laat weefselinfiltratie zien dat de distributie van de bloedvaten volgt. (j) Intracellulair fenotype van *M. marinum* co-lokalisatie met een bloedvat, in afwezigheid van macrofagen. Schaal afbeelding g = 100  $\mu\text{m}$ , schaal h t/m j = 25  $\mu\text{m}$ .

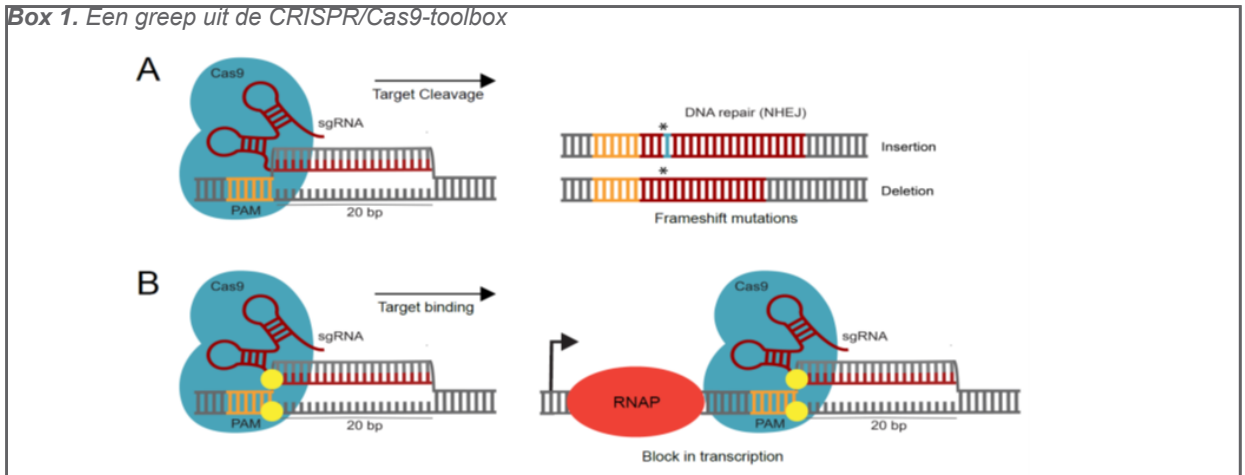
Dpf = days post fertilisation (aantal dagen na bevruchting), dpi = days post infection (aantal dagen na infectie).

### Translationeel onderzoek

Een bijzonder voorbeeld van hoe bevindingen bij zebrafissen vertaald kunnen worden naar klinisch onderzoek, is de ontdekking van de rol van de leukotriene-A4 hydrolase (LTA4H)-locus van de gastheer. Door genetische screening van zebrafissen op vatbaarheid voor infectie met Mmar bleken mutaties in het LTA4H-gen te leiden tot een hypergevoelig fenotype [21]. LTA4H is een enzym dat de balans reguleert tussen de pro- en anti-inflammatoire eicosanoïden (immuunregulerende hormonen), en is daarmee bepalend voor de geproduceerde hoeveelheid pro-inflammatoire tumornecrosefactor alfa (TNF- $\alpha$ ). Mutaties in de vis kunnen enerzijds leiden tot een hyperinflammatoir profiel met hoge TNF- $\alpha$ -productie, en anderzijds tot een hypo-inflammatoir profiel met lage TNF- $\alpha$ -productie; beide zijn geassocieerd met ernstiger infectie ten opzichte van een wildtype vis [21]. Bij patiënten met tbc-meningitis lijkt sprake te zijn van een vergelijkbaar beeld. In de normale bevolking komen mutaties (SNP's) in de

promotor van het LTA4H-gen voor en kan een onderverdeling gemaakt worden tussen mensen met een gemiddelde, hoge en lage LTA4H-productie, analoog aan de mutaties bij zebrafissen. Bij Vietnamese patiënten met tbc-meningitis lijkt de uitkomst van aanvullende behandeling met dexamethason voor deze drie LTA4H-categorieën verschillend. Patiënten met een profiel passend bij hoge LTH4A-productie (circa 10 procent van de patiënten), hadden een disproportioneel betere overleving met dexamethason in vergelijking met de gemiddelde (circa 40 procent van de patiënten) en lage (circa 50 procent van de patiënten) LTA4H [22]. Dat zou betekenen dat adjuvante behandeling met dexamethason wellicht bij een minderheid van de patiënten tot relevante afname in mortaliteit leidt en mogelijk contraproductief is bij patiënten met een hypo-inflammatoir profiel. Deze bevindingen hebben geleid tot de opzet van een nieuwe gerandomiseerde studie, waarin LTA4H toegepast wordt als een marker voor behandelingsucces van dexamethason [23].

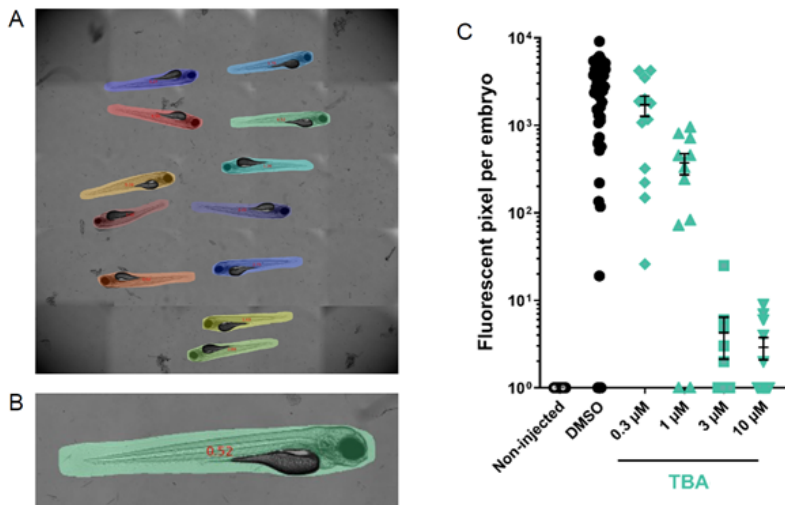
Box 1. Een greep uit de CRISPR/Cas9-toolbox



CRISPR-technologie een moleculaire genetische manipulatietechniek die kan worden toegepast in zowel prokaryoten als eukaryoten. Twee van de vele toepassingen worden hierboven afgebeeld.

(A) Met het wildtype Cas9-enzym is het mogelijk om het genoom met grote precisie aan te passen. Een RNA-molecuul (guide RNA of sgRNA), dat voor nagenoeg ieder targetgen ontworpen kan worden, vormt samen met het eiwit Cas9 (blauw) een complex dat precies knipt op de plek waar een deel van het RNA-molecuul complementair is aan het genoom (altijd in juxtapositie van een PAM-sequentie, in afbeelding oranje). Uiteindelijk leidt deze knipactiviteit tot een somatische mutatie, doordat het eigen DNA-reparatiemechanisme van de cel inserties of deleties veroorzaakt. De frameshiftmutaties leiden tot het elimineren van de genfunctie. (B) Ook is het mogelijk om de knipactiviteit van Cas9 te elimineren (dCas9) zodat het complex gebonden blijft aan het genoom en het RNA-polymerase (RNAP) verhindert RNA te maken voor eiwittranslatie. Deze techniek wordt CRISPRinterference (CRISPRi) genoemd.

**Figuur 3.** Automatische analyse van zebravislarvenplaatjes met behulp van deep learning (DL)-software.



A. Een masker (kleur) geeft de identificatie van de zebravis weer met behulp van DL. Iedere individuele vissenlarve krijgt een eigen masker, gebaseerd op de in DL gedefinieerde vorm van een zebravis. De getallen (in rood op de zebravislarven) geven de mate van infectie met fluoresceentiemycobacteriën aan, die gemeten wordt in een fluorescent kanaal (niet getoond).  
 B. Een vergrote weergave van één zebravislarve. De dooierzak (druppelvormig grijs oppervlak in de larve) wordt automatisch uitgesloten van analyse omdat deze autofluorescentie vertoont en dus niet meegeteld dient te worden.  
 C. Activiteit van de nieuwe inhibitor TBA, een aspartyl-tRNA synthetase (AspS) inhibitor (elk punt is een zebravislarve); fluorescentie (mate van infectie) neemt af bij toenemende concentraties TBA.

## Zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen

### Doelwitidentificatie met CRISPRi

Rond de eeuwwisseling was target-based drug discovery (TBDD) de belangrijkste strategie om nieuwe antibiotica te ontdekken. Hierbij wordt een essentieel 'targeteiwit', een mogelijk doelwit voor nieuwe antibiotica, gezuiverd waarna een stof wordt gezocht die dit eiwit in vitro remt. Helaas is deze aanpak voor antibioticumontwikkeling vrij onsuccesvol gebleken [24]. Veel van de stoffen falen in vivo, bijvoorbeeld omdat ze niet de bacteriële membraan kunnen passeren of door effluxpomp uit de bacterie worden verwijderd. Daarnaast is de mate van inhibitie van het essentiële targeteiwit van belang. Eiwitten die bij geringe inhibitie al een duidelijke remming in groei laten zien zijn de meest interessante targets. Door genexpressie in bacteriën gecontroleerd te verlagen met CRISPRi (BOX 1, B) is het nu mogelijk om de beste targets te identificeren. Met deze methode hebben Bosch et al. [25] laten zien dat voor veel essentiële eiwitten bijna 100 procent inhibitie nodig is voordat groei wordt geremd, wat betekent dat dit geen goede antibioticumtargets zijn. Het meest interessant voor TBDD zijn de eiwitten die slechts deels geremd hoeven te worden voor groeionderbreking. In tegenstelling tot

TBDD kan met behulp van dezelfde methode ook een onbekend target gevonden worden voor een nieuwe werkzame stof. Men kan een mycobacteriële bank maken waarin de expressie van alle potentiële targets met behulp van CRISPRi verlaagd wordt (hypomorf). Wanneer een specifieke hypomorf gevoeliger is voor de nieuwe stof, acteert deze stof zeer waarschijnlijk op het gen met de verlaagde expressie of een gen met een verwante functie.

### In vivo naar geneesmiddelen zoeken

Hoewel bovengenoemde fenotypische onderzoeken een stap in de goede richting zijn, zijn er nog andere hindernissen te nemen voor de doorontwikkeling van nieuwe antimicrobiële middelen. Om de werking en toxiciteit in vivo te controleren, is weer de zebravis interessant, gebruikmakend van de voordelen van dit infectiemodel. Met behulp van een speciale injectie-robot kunnen honderden zebravisembryo's in een experiment geïnfecteerd worden, waarna stoffen in het water kunnen worden toegevoegd om het in vivo-effect te testen [26]. De effectiviteit wordt uitgelezen met behulp van fluoresceentiemicroscopie en op 'deep learning' gebaseerde software die de zebravislarven herkent en de mate van besmetting kan uitlezen.

Deze software kan ook aangeven of de vissen een afwijkende vorm hebben, wat kan duiden op toxiciteit (figuur 3). In eerste instantie zijn alle eerste- en tweedelijns-middelen getest in dit systeem, met goede resultaten; *Mmar* bleek bij de vis vaak dezelfde gevoeligheid te vertonen voor middelen als *Mtb* bij mensen [27]. In een vervolgstudie zijn 240 nieuwe stoffen getest die in vitro goed werkten tegen *Mtb* en *Mmar*. Van deze stoffen werken er bij zebravissen maar 14 tegen *Mmar*, wat bevestigt dat dit een belangrijke bottleneck is in de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. Onder deze werkzame stoffen bevond zich een nieuwe remmer van het essentiële aspartyl-tRNA synthetase *AspS* (figuur 3) [28]. De volgende stap is om deze in vivo-activiteit te bevestigen in een muizenmodel.

## Meer toepassingen van het zebravismodel met CRISPR/Cas9

### Gastheegerichte therapie

Naast het gebruik van antibiotica die direct aangrijpen op *Mtb* is er steeds meer interesse in het gebruik van medicijnen die aangrijpen op de gastheerrespons. Met CRISPR/Cas9 (BOX 1) in combinatie met next-generation sequencing is het mogelijk om een biologisch effect direct te koppelen aan een gen of een set genen. Recentelijk heeft een CRISPR/Cas9-screen met macrofagen aangetoond dat de aryl hydrocarbon receptor (AhR) in de gastheer essentieel is voor de groei van *Mtb*. Remming van deze signaleringsroute met behulp van het klinisch goedgekeurde medicijn cerdulatinib remt dan ook de groei van *Mtb* in vitro [29]. Een voorbehoud is dat deze studie is uitgevoerd met de niet-virulente bacterie BCG. Aangezien het gedrag van deze vaccinstam erg verschilt van dat van virulente tuberculosebacteriën is de verwachting dat er in de toekomst meer en nieuwe gastheer-eiwitten geïdentificeerd worden die een belangrijk effect hebben op de groei of invasie van gastheercellen. De identificatie van deze eiwitten en bijbehorende cellulaire signaleringsroutes kan leiden tot hergebruik (repurposing) van bestaande medicijnen. Naar verwachting zal het klinische effect van deze gastheegerichte therapieën wel kleiner zijn dan van conventionele antibiotica. Daarnaast zullen ze alleen ingezet worden als er geen andere behandelopties zijn of als aanvulling op antimycobacteriële therapie.

### Knock-downmodellen

De CRISPR-techniek is niet alleen geschikt voor het screenen van gastheercellen maar ook voor het maken van mutanten bij muizen en zebravissen. Vooral bij zebravissen is het een krachtige techniek, omdat injectie van het systeem in het stadium van een- of tweecellige embryo's kan leiden tot wel 80 procent homozygote deletie [30]. Het is dus niet altijd nodig om vissen te laten doorgroeien tot volwassen exemplaren of om nakomelingen te gebruiken, wat een groot verschil is met andere diersystemen zoals de muis. Met het CRISPR-systeem bestaat nu de mogelijkheid om de rol van de humane SNP's die is geassocieerd met een ander verloop van *Mtb*-infecties, direct te bestuderen bij zebravissen. In deze context kunnen dan ook direct verschillende behandelingen worden getest. Dit biedt mogelijkheden om aanvullende therapieën te ontwikkelen gericht op de genetische predispositie van de patiënt.

## Conclusie en toekomstvisie

Quote Beijerinck: *“De eenige lichtstraal in de duistere geschiedenis van dit voorwerp der ontzetting, is de gerechtigde hoop op het verdwijnen daarvan van de aarde, in een niet te verre toekomst, door de samenwerking van alle wetenschappen”*.

Concluderend is de progressie van onderzoekstechnieken zodanig, dat er inderdaad een lichtstraal is die verder reikt dan in de tijd van Beijerinck. De kruisbestuiving tussen verschillende onderzoeksvelden is essentieel geweest voor de ontwikkeling van het zebravismodel en CRISPR-gerelateerde moleculaire technieken. Ruim een eeuw later is het formaat van de bacterie van ondergeschikt belang, aangezien recombinante technieken het toelaten om de 'vindplaats' fluorescent in beeld en de pathogenese verder in kaart te brengen. De identificatie van het ESX-1-systeem, dat essentieel is voor virulentie, heeft geleid tot een exponentiële groei van het onderzoek naar dit secretiesysteem, een uiterst leerrijke biologische eigenschap. Met behulp van het zebravissenmodel, dat een aanzienlijke kostenbesparing en tijdwinst met zich meebrengt, zijn de interacties tussen gastheer en mycobacterie verder in kaart gebracht. Het risico op teleurstelling is afgenomen, ook in het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen door gebruik te maken van CRISPR-technieken en het zebravisscreeningsmodel. De WHO

heeft een zeer ambitieus plan om in 2030 al een reductie te hebben van 90 procent van het aantal mensen dat overlijdt aan tbc ten opzichte van 2015. Met behulp van meer onderzoek en nieuwe middelen is dit hopelijk nog steeds haalbaar.

## Referenties

1. Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis*. 2005;85:277-93.
2. Ruys AC. De betrouwbaarheid van cavia-en kweekproef voor het aantonen van tuberkelbacillen. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1938;1:18-23.
3. Lin PL, Ford CB, Coleman MT et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med*. 2014;20:75-9.
4. Dijkman K, Sombroek CC, Vervenne RAW, et al. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. *Nat Med*. 2019; 25:255-62.
5. Phillips JB, Westerfield M. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis Model Mech*. 2014;7:739-43.
6. van Leeuwen LM, van der Sar AM, Bitter W. Animal models of tuberculosis: zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014. 5:a018580.
7. Bouz G, Al Hasawi N. The zebrafish model of tuberculosis - no lungs needed. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44:779-92.
8. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496:498-503.
9. Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. *Dis Model Mech*. 2014;7:777-84.
10. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 2008;18:729-41.
11. Ho PL, Ho P, Fung BK, Ip WY, Wong SS. A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection following systemic steroid therapy. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:232-3.
12. Commandeur S, Iakobachvili N, Sparrius M, et al. Zebrafish Embryo Model for Assessment of Drug Efficacy on Mycobacterial Persists. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e00801-20.
13. Stamm LM, Morisaki JH, Gao L, et al. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*. 2003;198:1361-8.
14. van der Wel N, Hava D, Houben D, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129:1287-98.
15. Groschel MI, Sayes F, Shin SJ, et al. Recombinant BCG Expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Rep*. 2017;18:2752-65.
16. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, et al. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 2010;327:466-9.
17. Ramakrishnan L. Looking within the zebrafish to understand the tuberculous granuloma. *Adv Exp Med Biol*. 2013;783:251-66.
18. van Leeuwen LM, van der Kuip M, Youssef SA, et al. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum*. *Dis Model Mech*. 2014;7:1111-22.
19. van Leeuwen LM, Boot M, Kuijl C, et al. Mycobacteria employ two different mechanisms to cross the blood-brain barrier. *Cell Microbiol*. 2018;20:e12858.
20. Lammie GA, Hewlett RH, Schoeman JF, Donald PR. Tuberculous cerebrovascular disease: a review. *J Infect*. 2009;59:156-66.
21. Tobin DM, Vary JC Jr, Ray JP, et al. The *Ita4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell*. 2010;140:717-30.
22. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell*. 2012;148:434-46.
23. Donovan J, Phu NH, Thao LTP, et al. Adjunctive dexamethasone for the treatment of HIV-uninfected adults with tuberculous meningitis stratified by Leukotriene A4 hydrolase genotype (LAST ACT): Study protocol for a randomised double blind placebo controlled non-inferiority trial. *Wellcome Open Res*. 2018;3:32.
24. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:29-40.
25. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, et al. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of *M. tuberculosis*. *Cell*. 2021;184:4579-92 e24.
26. Spaink HP, Cui C, Wiweger MI, et al. Robotic injection of zebrafish embryos for high-throughput screening in disease models. *Methods*. 2013;62:246-54.
27. Ho VQT, Verboom T, Rong MK, Habjan E, Bitter W, Speer A. Heterologous Expression of *ethA* and *katG* in *Mycobacterium marinum* Enables the Rapid Identification of New Prodrugs Active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65:e01445-20.
28. Habjan E, Ho VQT, Gallant J, et al. Anti-tuberculosis Compound Screen using a Zebrafish Infection Model identifies an Aspartyl-tRNA Synthetase Inhibitor. *Dis Model Mech*. 2021;14:dmm049145.
29. Lai Y, Babunovic GH, Cui L, et al. Illuminating Host-Mycobacterial Interactions with Genome-wide CRISPR Knockout and CRISPRi Screens. *Cell Syst*. 2020;11:239-251 e7.
30. Naert T, Tulkens D, Edward NA, et al. Maximizing CRISPR/Cas9 phenotype penetrance applying predictive modeling of editing outcomes in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Sci Rep*. 2020;10:14662.