

VU Research Portal

The mycosins of pathogenic mycobacteria: digesting the role of conserved proteases in type VII secretion

van Winden, V.J.C.

2021

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Winden, V. J. C. (2021). *The mycosins of pathogenic mycobacteria: digesting the role of conserved proteases in type VII secretion.*

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Achtergrond

Mycobacterium, het enige geslacht in de familie Mycobacteriaceae, bestaat uit een groep van bijna 200 verschillende bacteriesoorten. Alhoewel een groot deel van deze soorten onschadelijke bodembacteriën zijn, is het geslacht *Mycobacterium* vooral bekend door twee beruchte infectieziekteverwekkers; *Mycobacterium tuberculosis* en *Mycobacterium leprae*, die de veroorzakers zijn van respectievelijk tuberculose en lepra. Terwijl lepra tegenwoordig een minder prominente ziekte is, blijft tuberculose een van de meest prevalentie infectieziektes wereldwijd en is het zelfs, met 1,4 miljoen sterfgevallen in 2019, de meest dodelijke ziekte veroorzaakt door een enkele infectieziekteverwekker. Met de ontwikkeling van het levende vaccin *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG), dat met name bij kinderen een verhoogde bescherming geeft tegen tuberculose, en de beschikbaarheid van een zware en langdurige behandeling met antibiotica is tuberculose in Europa en de Verenigde Staten sterk teruggedrongen. Echter zijn er grote investeringen nodig om ook met name in Azië en Afrika de prevalentie terug te dringen. Met 10 miljoen nieuwe besmettingen in 2019 lijkt de complete uitroeiing van deze infectieziekte namelijk nog ver weg.

De reden dat tuberculose zo moeilijk te behandelen is komt door een aantal unieke eigenschappen van *M. tuberculosis*. De bacterie verspreidt zich door de lucht via kleine druppeltjes, bijvoorbeeld wanneer iemand met een actieve tuberculosebesmetting moet hoesten. Deze kleine druppeltjes komen vervolgens via de luchtwegen het lichaam van andere mensen binnen, waarna specifieke immuuncellen, genaamd macrofagen, deze bacteriën opnemen. Terwijl normaliter opgenomen bacteriën efficiënt worden gedood door deze immuuncellen, kan *M. tuberculosis* overleven in deze cellen. Het schuilen in macrofagen biedt de bacterie een extra bescherming, niet alleen tegen uitroeiing door ons immuunsysteem, maar ook tegen antibiotica. Twee unieke eigenschappen van deze bacterie zijn gerelateerd aan het vermogen van de ziekteverwekker om te overleven in macrofagen. Ten eerste wordt de bacteriële cel omgeven door een unieke celenvelop, bestaande uit twee membranen, een binnenmembraan (inner membrane, IM) en een specifieke en zeer ondoordringbare buitenmembraan (outer membrane, OM). Door deze unieke celenvelop worden veel antibiotica en andere externe stoffen, buiten de bacteriecel gehouden. Dit is één van de redenen dat tuberculose behandeld dient te worden met meerdere antibiotica voor een periode van ten minste 6 maanden. Daar bovenop wordt het door de opkomst van zogeheten multi-drug resistente (MDR) en extreme-drug resistente (XDR) *M. tuberculosis* stammen nog lastiger om patiënten succesvol te behandelen. De tweede unieke eigenschap van de bacterie is de aanwezigheid van de zogenaamde type VII secretie (T7S) systemen. Alhoewel de ondoordringbaarheid van de celenvelop fungeert als een cruciale beschermingslaag voor de ziekteverwekker, moeten er nog steeds moleculen, zoals nutriënten, maar ook uitgescheiden eiwitten die interacties aangaan met

immuuncellen, over de celenvlop getransporteerd worden. Voor het uitscheiden van eiwitten beschikt *M. tuberculosis* over vijf gerelateerde T7S systemen, genaamd ESX-1 tot en met ESX-5. Een deel van de eiwitten die via het ESX-1 systeem worden uitgescheiden (dit proces wordt ook wel de secretie van substraten genoemd) zijn betrokken bij het overleven van *M. tuberculosis* in de macrofagen. Op deze manier zijn het vermogen om te overleven in macrofagen, de unieke celenvlop en de T7S systemen van deze bacterie met elkaar verbonden en alle drie verantwoordelijk voor het succes als ziekteverwekker en de moeilijke behandeling van *M. tuberculosis*.

Door de belangrijke rol die het ESX-1 systeem speelt in de infectie en de overleving van de bacterie, is het onderzoek naar T7S systemen de laatste twee decennia sterk toegenomen. Zo weet men nu dat de deletie van een groot deel van de *esx-1* genen (die voor dit systeem encoderen) één van de voornaamste redenen is dat het levende vaccin *Mycobacterium bovis* BCG niet ziekteverwekkend is. Het onderzoek naar de T7S systemen is ook verder uitgebreid naar de andere ESX systemen, waardoor nu ook ESX-3 en ESX-5 functioneel zijn bestudeerd. Een veel gebruikte bacteriesoort voor studies naar ESX-1, ESX-3 en ESX-5 is *Mycobacterium marinum*. Deze bacterie is sterk gerelateerd aan *M. tuberculosis* en veroorzaakt een ziektebeeld in vissen dat vergelijkbaar is met tuberculose in mensen. De voordelen van het werken met *M. marinum* zijn dat deze bacterie minder gevaarlijk is voor mensen en dat *M. marinum* sneller groeit in vergelijking met *M. tuberculosis*. Onderzoek in zowel *M. marinum* als *M. tuberculosis* liet zien dat de ESX-3 en ESX-5 systemen essentieel zijn voor deze bacteriën om te groeien, door hun rol in het opnemen van voedingsstoffen. Deze ontdekkingen hebben het belang van het onderzoek naar de T7S systemen alleen maar verder onderstreept en de laatste jaren is er dan ook een nog sterkere toename geweest in ons begrip, niet alleen van de functie van deze systemen maar ook van de grote groep uitgescheiden substraten en de opbouw van de secretiemachinerie. De substraten van het ESX-1 systeem zijn al langer onderdeel van onderzoek door de centrale rol van deze eiwitten in de virulentie van *M. tuberculosis*. Hiernaast wordt er nu ook meer gekeken naar de eiwitten die door de ESX-3 en ESX-5 systemen worden uitgescheiden. Het ESX-5 systeem is bijvoorbeeld betrokken bij de uitscheiding van meer dan 100 verschillende eiwitten. Van de meeste van deze eiwitten is het echter nog onbekend wat de functie is.

De machinerie van deze T7S systemen lijken sterk op elkaar en bestaan uit een set van geconserveerde eiwitten, waarvan vijf membraan gebonden zijn. Vier van deze membraangebonden componenten, EccB, EccC, EccD en EccE, vormen samen het daadwerkelijke secretiekanaal, dat de substraten vanuit het interieur van de cel, het cytosol, over het binnenmembraan transporteert. Het vijfde membraan gebonden component is het mycosine protease (MycP). Dit eiwit is sterk geconserveerd in alle T7S systemen, niet alleen van mycobacteriën maar ook van minder sterk verwante bacteriën. Op basis van eerdere experimenten lijkt MycP geen onderdeel te zijn van het EccBCDE



secretiecomplex, alhoewel de mycosines wel essentieel zijn voor het functioneren van de ESX-systemen. Mycosines zijn zogenaamde proteases, wat wil zeggen dat mycosines andere eiwitten knippen of kunnen afbreken. Dit is doorgaans een sterk gereguleerd proces, wat bijvoorbeeld resulteert in een specifieke verandering van de functie of eigenschappen van het geknipte eiwit. Alhoewel mycosines dus proteases zijn, lieten eerdere experimenten zien dat de knip- of proteolytische eigenschap van de mycosine van het ESX-1 systeem, MycP₁ niet nodig is voor zijn essentiële functie binnen dit systeem van *M. tuberculosis*.

Inhoud van dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift was om een beter begrip te verkrijgen van de rol van de mycosine proteases (MycP) in het functioneren van T7S systemen in pathogene mycobacteriën.

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt met behulp van een literatuurstudie de huidige kennis over de mycobacteriële celenvelop en de verschillende secretiesystemen die aanwezig zijn in mycobacteriën besproken.

In **hoofdstuk 2** begonnen wij ons onderzoek door genetische deleties te maken van de mycosines van de ESX-1 en ESX-5 systemen van *M. marinum*. Op deze manier konden wij specifiek naar de functie van deze proteases kijken. Wij zagen dat zowel een deletie van *mycP₁* (encoderend voor de MycP van ESX-1) als *mycP₅* (encoderend voor de MycP van ESX-5) zorgde voor een compleet verlies van secretie van het respectieve secretiesysteem. In andere woorden, zowel MycP₁ als MycP₅ zijn essentieel voor de functionaliteit van hun ESX-systeem. Aangezien mycosines behoren tot de zogenoemde groep van serine proteases, waarvan bekend is welke aminozuren van het protease betrokken zijn bij het knippen of afbreken van andere eiwitten keken wij of een inactieve mutant van de mycosines de functionaliteit van de secretiesystemen kon herstellen. Tegen onze verwachting in zagen wij voor zowel het ESX-1 als ESX-5 systeem secretie van substraten in de aanwezigheid van de inactieve MycP₁ en MycP₅ varianten. Hierdoor konden wij concluderen dat de essentiële functie van mycosines niet afhankelijk is van hun proteolytische activiteit. In plaats daarvan zagen wij dat MycP₁ en MycP₅ hun respectievelijke ESX membraankanaal stabiliseerde door middel van een directe interactie en dat dit proces inderdaad niet afhankelijk is van de proteolytische activiteit van de mycosines.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven wij hoe we het MycP₅ eiwit hebben gefuseerd aan de EccB component van het ESX-5 systeem. Dit fusie-construct was gebaseerd op een vergelijkbaar gen dat te vinden is in een T7S gencluster van *Bifidobacterium dentium*. Dit gen resulteerde in de expressie van een stabiel en functioneel fusie-eiwit van EccB₅-MycP₅, dat ESX-5 secretie kon herstellen in *M. marinum* stammen waar het *eccB₅* of *mycP₅* gen was verwijderd. Vervolgens hebben wij dit proces herhaald in een ESX-5

systeem van *Mycobacterium xenopi*, die tot expressie is gebracht in de niet pathogene soort *Mycobacterium smegmatis*. In dit systeem konden wij zowel *eccB*₅ als *mycP*₅ vervangen door ons fusie-construct. We observeerden dat dit gen ook een stabiel en functioneel fusie-eiwit leverde, wat resulteerde in een functioneel ESX-5 systeem. Bovendien zagen we dat het *EccB*₅-*MycP*₅ fusie-eiwit een stabiel onderdeel was van het ESX-5 complex. Samen suggereren deze resultaten dat *MycP*₅ het ESX-5 membraancomplex stabiliseert door een directe interactie met *EccB*₅.

In **hoofdstuk 4** hebben wij gekeken welk deel (of domein) van de mycosines betrokken is bij het uitoefenen van de essentiële functie van deze proteases. Hiervoor hebben wij delen van de genen van *mycP*₁ en *mycP*₅ met elkaar omgewisseld, en deze zogenaamde hybride constructen geïntroduceerd in de eerdergenoemde mycosine deletiestammen. We zagen dat zowel het proteasedomein als het membraananker van mycosines specifiek waren voor hun desbetreffende ESX-systeem. Daarentegen konden wij de zogenaamde N-terminale extensie, die gewikkeld zit rondom het proteasedomein, vrij uitwisselen tussen de mycosines van het ESX-1 en ESX-5 systeem. Verdere analyse van de eiwitstabiliteit toonde aan dat dit onderdeel van het eiwit alleen een rol speelt in de structurele integriteit van *MycP*. Wij hebben vervolgens het protease domein verder ontleed door te kijken naar een aantal uitstekende delen, de zogenaamde loops. De functie van deze loops, die uniek zijn voor de mycosine eiwitten, is nog onbekend. Wij observeerden dat loop 1 en 2 waarschijnlijk betrokken zijn in de stabilisering van het eiwit, terwijl loop 3 en de *MycP*₅ specifieke loop 5 niet van belang waren voor zowel de stabiliteit als functionaliteit. Samen geven onze resultaten een eerste overzicht van de mogelijke rollen van de individuele *MycP* delen in de functionaliteit en stabilisatie van het ESX-membraankanaal.

In **hoofdstuk 5**, beschrijven wij een methode, een zogenaamde high-throughput screen, voor het identificeren van kleine chemische verbindingen die de proteolytische activiteit van *MycP*₁, en potentieel ook de andere mycosines, kunnen blokkeren. Terwijl wij succesvol waren in het opzetten van deze methode, konden wij geen verbindingen vinden die succesvol de proteolytische activiteit van *MycP*₁ konden blokkeren. Mogelijk kan deze set-up voor toekomstige screens worden toegepast. Hiernaast waren wij in staat om voor het eerst substantiële hoeveelheden van stabiel en oplosbaar *MycP*₅ te isoleren met behulp van het modelorganisme *Escherichia coli*, waarmee wij een initiële proteolytische karakterisatie van *MycP*₅ konden uitvoeren.

In **hoofdstuk 6** reflecteren wij op de resultaten van dit proefschrift en het belang van onze bevindingen voor het begrip van het functioneren van mycobacteriële type VII secretiesystemen en de zoektocht naar nieuwe, werkzame medicijnen voor tuberculose.

