

Abstract

Project Code: MRG5480181

Project Title: Variation in autophagic control to different genotypic families of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages.

Investigator: Assist. Prof. Marisa Ponpuak, Mahidol University

E-mail Address: marisa.pon@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years with extension

Project Aims: As autophagy has been demonstrated as a key pathway in innate immune defense to restrict *Mycobacterium tuberculosis* growth inside host macrophages. Induction of autophagy has been shown to promote mycobacterial phagosome acidification and acquisition of lysosomal hydrolases resulting in the elimination of intracellular *M. tuberculosis* reference strains such as H37Rv and the vaccine strain BCG. However, the role of autophagy against *M. tuberculosis* clinical strains such as those belong to the Beijing genotype found to be hyper-virulent as demonstrated by their higher ability to survive in host macrophages, to cause higher bacterial load and mortality in animal models, and to cause heavy AFB smear-positive sputum in patients has never been examined. Therefore, we sought out to determine whether there is an alteration in autophagic control against strains of the Beijing genotype which may explain the hyper-virulence possessed by this family.

Methods: Here, we obtained *M. tuberculosis* clinical strains belonging to the Beijing genotype associated with hyper-virulence prevalent in Thailand and East Asia regions and the East African Indian genotype associated with low-virulence. We then compared the autophagic restriction by host macrophages against these strains comparing to that of the laboratory *M. tuberculosis* reference strain H37Rv. We then characterized the underlying autophagy resistant mechanism utilized by the Beijing strains.

Results: Our results showed that the Beijing strains display greater ability to resist autophagic killing as compared to that of the reference strain H37Rv and a strain belonging to the East African Indian genotype. In addition, we revealed a possible underlying mechanism in which the resistance of the Beijing strains to autophagic restriction is not simply achieved by blocking autophagy-mediated acidification of their phagosomes or by inhibiting the autophagic flux in host cells but achieved by preventing autophagolysosome biogenesis as demonstrated by their ability to inhibit the increased acquisition of cathepsin D, an enzyme of lysosomal acid hydrolases and a marker of lysosome, into mycobacterial compartments upon autophagy induction.

Conclusions: In this study, we discovered a previously unrecognized ability of the *M. tuberculosis* Beijing strains to evade host autophagy. In addition, we have characterized the associated underlying mechanism in which the Beijing strains can inhibit autophagolysosome biogenesis upon autophagy induction. Our work may have important implications for tuberculosis treatment especially in regions prevalent by the Beijing genotype.

Discussions and Future Directions: Our study showed that the *M. tuberculosis* Beijing strains possess the ability to resist autophagic elimination by host macrophages. Interestingly, *H. pylori* was also shown to evade autophagic killing by inhibiting autophagolysosome biogenesis in which the bacteria can do so through the use of the *H. pylori* vacuolating toxin (VacA). Whether *M. tuberculosis* Beijing strains possess similar or equivalent toxin/protein is not known. As a recent whole-genome sequencing of strains belonging to the *M. tuberculosis* Beijing family has been conducted, mining and comparing sequencing data between Beijing and non-Beijing strains may give insight into potential candidate genes that may play a role in the autophagic evasion. Their subsequent characterization will also provide a novel drug target. This is utmost important as it was recently reported that two of the first-line tuberculosis drugs, isoniazid and pyrazinamide, require autophagy pathway for their actions and thus the Beijing strains may have greater ability to resist these first-line tuberculosis treatment.

Keywords: Autophagy, Beijing strains, *M. tuberculosis*, Mycobacteria, Tuberculosis

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480181

ชื่อโครงการ : การศึกษาและตรวจสอบความแตกต่างในกระบวนการจับกินเชื้อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน ที่ก่อให้เกิดโรควัณโรคของเซลล์เจ้าบ้าน

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.มาริสา พลพวก มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมลล์: marisa.pon@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี และ ขยายเวลา

วัตถุประสงค์: เนื่องจากกระบวนการออโตฟาจีถูกค้นพบว่าเป็นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญของโฮสต์ที่ใช้ในการกำจัดเชื้อวัณโรค การกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจีในเซลล์โฮสต์ก่อให้เกิดความเป็นกรดและการได้มาของไลโซโซมเอนไซม์ ในฟาโกโซมของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เชื้อถูกฆ่าตายในที่สุด แต่การศึกษาที่ผ่านมา ล้วนแต่ใช้มัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงเท่านั้น และยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการออโตฟาจีต่อการฆ่าเชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยเฉพาะสายพันธุ์ไบจิงที่ระบาดมากในไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียง ซึ่งมีความรุนแรงของเชื้อที่สูง สามารถที่จะทนต่อกลไกการกำจัดเชื้อของเซลล์โฮสต์ และ มีความรุนแรงที่จะก่อโรคในสัตว์ทดลองได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ตลอดจนก่อให้เกิดจำนวนเชื้อในเสมหะคนไข้ที่มากกว่า ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยในโครงการนี้จึงได้ศึกษาว่าเชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้รุนแรงกว่าสายพันธุ์อื่นนี้ มีความสามารถที่จะต้านทานกระบวนการฆ่าเชื้อออโตฟาจีได้หรือไม่

วิธีทดลอง: คณะผู้วิจัยได้นำเชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิง และ สายพันธุ์ฮิสแอฟริกานินเดียซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงของเชื้อที่ต่ำ มาทำการทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง ถึงความสามารถในการต้านทานกระบวนการฆ่าเชื้อออโตฟาจีในเซลล์มาโครฟาจ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาเชิงลึกเพื่อหากลไกที่เชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิง ใช้ในการต่อต้านกระบวนการฆ่าเชื้อออโตฟาจี

ผลการทดลอง: คณะผู้วิจัยค้นพบว่า เชื้อมัคโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิง ที่ระบาดมากในไทย สามารถที่จะต่อต้านกระบวนการฆ่าเชื้อออโตฟาจีของเซลล์โฮสต์ได้ ซึ่งกลไกที่สายพันธุ์ไบจิงใช้ในการต่อต้านกระบวนการฆ่าเชื้อออโตฟาจีคือการสกัดกั้นการรวมกันของไลโซโซมกับออโตฟาโกโซม ทำให้ไลโซ

โซมเอนไซม์ ไม่สามารถเข้าไปย่อยเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิงได้ สายพันธุ์ไบจิงจึงรอดพ้นจากกระบวนการฆ่าเชื้อออกโตฟาจี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง: คณะผู้วิจัยได้ค้นพบว่าเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิงมีความสามารถในการต้านการฆ่าโดยกระบวนการออกโตฟาจี นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังค้นพบเชิงลึกถึงกลไกที่ทำให้สายพันธุ์ไบจิงสามารถต่อต้านการฆ่าเชื้อโดยกระบวนการออกโตฟาจีได้ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้มีความสำคัญต่อการรักษาผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ไบจิง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดมากในประเทศไทย โดยเฉพาะได้มีการเผยแพร่งานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ว่า กลไกการทำงานของยา Isoniazid (ไอโซไนอะซิด) และ Pyrazinamide (ไพราซิनाไมด์) ซึ่งเป็น 2 ตัวยา ในยาอันดับแรก (First line) ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคนั้น ขึ้นอยู่กับการทำงานของกระบวนการออกโตฟาจี ดังนั้นถ้าสายพันธุ์ไบจิงสามารถสกัดกั้นกระบวนการออกโตฟาจีได้ สายพันธุ์ไบจิงก็น่าที่จะต่อต้านการทำงานของยาทั้ง 2 ตัวนี้ได้ ซึ่งก็มีข้อมูลบ่งชี้ว่าสายพันธุ์ไบจิง มีความสามารถในการดื้อยามากกว่ามัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต: จากการค้นพบของคณะผู้วิจัยในโครงการนี้ ว่าเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ไบจิงสามารถที่จะต่อต้านกระบวนการฆ่าเชื้อออกโตฟาจีได้นั้น คณะผู้วิจัยขอเสนอ งานวิจัยในอนาคตเพื่อต่อยอดดังนี้ เนื่องจากได้มีการเผยแพร่ข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ไบจิงเมื่อไม่นานมานี้ ดังนั้นการเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นกับสายพันธุ์ไบจิง จะสามารถทำให้ทราบถึงจีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งก็น่าจะมีจีนที่เป็นตัวก่อให้เกิดความต้านทานของสายพันธุ์ไบจิงต่อกระบวนการฆ่าเชื้อออกโตฟาจีอยู่ การศึกษาในเชิงลึกว่าจีนหรือโปรตีนตัวไหนมีความสำคัญต่อการต้านกระบวนการออกโตฟาจีในสายพันธุ์ไบจิง จะทำให้เราค้นพบเป้าหมายของยาตัวใหม่เพื่อการพัฒนาต่อยอดต่อไป ซึ่งจะมีความสำคัญมากโดยเฉพาะถ้าสายพันธุ์ไบจิง มีความสามารถในการดื้อยา Isoniazid (ไอโซไนอะซิด) และ Pyrazinamide (ไพราซิनाไมด์) ที่มากกว่าสายพันธุ์อื่น

คำหลัก : ออกโตฟาจี, สายพันธุ์ไบจิง, เชื้อวัณโรค, มัยโคแบคทีเรีย, วัณโรค