UPPSALA
UNIVERSITET

Användning och möjligheter för bakteriofagterapi

Björn Greijer

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Användning och möjligheter för bakteriofagterapi

Björn Greijer

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Bakteriofagterapi är en metod för behandling av bakteriella infektioner som länge har försummats i Västeuropa och amerika, till skillnad från i Östeuropa där fagterapi har använts i årtionden. Med ökningen av antibiotikaresistenta bakterier och nedgången i nya antibiotika som tas fram har man börjat se till fagterapi som ett alternativ. Virus som angriper bakterier, bakteriofager, kan användas för att behandla infektioner. Fager är ofta specifika för särskilda bakterier, men metoder finns för att hitta virus med bredare värdspektrum, och de kan kombineras i en cocktail för att täcka flera typer av bakterier. Fagterapi har använts för att avlägsna biofilm både i medicinska och industriella sammanhang, och det kan användas i kombination med antibiotika med god verkan. Dessutom har man inom livsmedelsindustrin användning av fagterapi för att förebygga kontaminering av livsmedel. Genetisk modifiering av bakteriofager kan öka deras effektivitet genom att kombinera önskvärda egenskaper från olika virus, och ge dem egenskaper som tillåter för behandling av andra typer av sjukdomar. Det finns dock en del problem med fagterapi. Bestämmelser kräver uttömmande kliniska tester innan en fag kan användas på människor, och eftersom det handlar om virus kan allmänheten vara motvillig på grund av brist på kunskap utanför fältet. Det är dock en metod som har potential för framtida bruk.

Inledning

Ett av de stora problemen inom modern medicin är antibiotikaresistenta bakterier. Överanvändning av antibiotika under senare delen av 1900-talet har lett till ett högt selektivt tryck för resistens hos bakterier, och idag har resistensgener spridits så att multiresistenta infektioner tar liv i fall där rutinbehandling hade räckt till för bara några år sedan. Bakteriell resistens mot antibiotika har känts till nästan lika länge som antibiotika har använts, men på senare år har det blivit allt vanligare på grund av utbredd användning av dessa antimikrobiella ämnen. Resistens är särskilt vanligt i sjukhus, där bakterier kan exponeras för antibiotika oftare. Ett exempel på en sådan bakterie är meticillin-resistent *Staphylococcus aureus*, också känd som MRSA (Davies & Davies 2010).

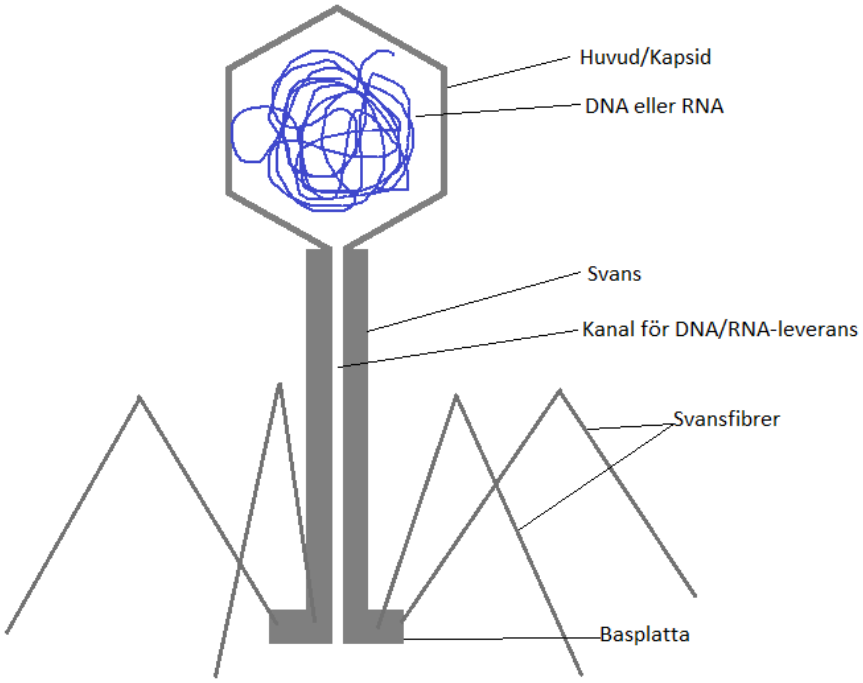
Det finns ett antal mekanismer för antibiotikaresistens. Några exempel är β-laktamaser, enzymer som bryter ned β-laktam-baserade antibiotika, mutationer som modifierar antibiotikats mål, till exempel ribosomalt RNA och cellväggens peptidoglykan. Vissa bakterier kan pumpa ut de giftiga molekylerna ur cellen, och andra kan modifiera dem eller, som β-laktamaserna, bryta ned dem helt. Man har förutsett att det kan finnas nära 400 olika typer av resistensgener utifrån sekvenserade bakterier (Davies & Davies 2010). Forskare har sökt alternativ till antibiotika, och har funnit ett sådant i bakteriofager.

Bakteriofager, eller bara fager har länge använts teraputiskt i östeuropa, i länder som Polen, Georgien och före-detta Sovjetunionen. Ett stort antal studier har där gjorts på människor, men majoriteten av dessa har skrivits på andra språk än engelska, och få är tillgängliga i Västeuropa. De är dock eniga om effektiviteten och säkerheten av bakteriofager, enligt en review av Sulakvelidze och medförfattare (2001).

Fagterapi började användas före antibiotika, men glömdes i stort sett bort utanför Östeuropa då fager var dåligt förstådda, och antibiotika var ett för tiden bättre alternativ. Med dagens kunskap om hur bakteriofager verkar, och med framsteg inom bioteknologi, såsom syntetisk biologi, kan virus skräddarsys för specifika bakterier, få ett bredare spektrum av värdorganismer, och hjälpa till vid behandling med antibiotika. Blandningar med flera olika virus på samma gång (s.k. cocktails) kan användas för att fånga ett bredare spektrum av bakterier och förebygga att resistens mot fager uppkommer.

Bakteriofagens anatomi och livscykel

Bakteriofager är virus som infekterar bakterier. De är uppbyggda av DNA eller RNA omslutet av ett proteinhölje kallat huvud, eller kapsid, med en svans som har svansfibrer på änden (Figur 1). Svansen kan ha olika längd beroende på typen av fag, och är ibland kontraherbar. Svansfibrerna binder till bakteriens yta i det första steget av infektion. Vad de binder varierar med typen av virus, men kan vara nästan vilken struktur som helst på bakteriens yta. Fager kan adsorbera till bakterien med hjälp av polysackarider, kanalproteiner, delar av cellvägg eller cellmembran, flageller, etc. (Silva *et al.* 2016).

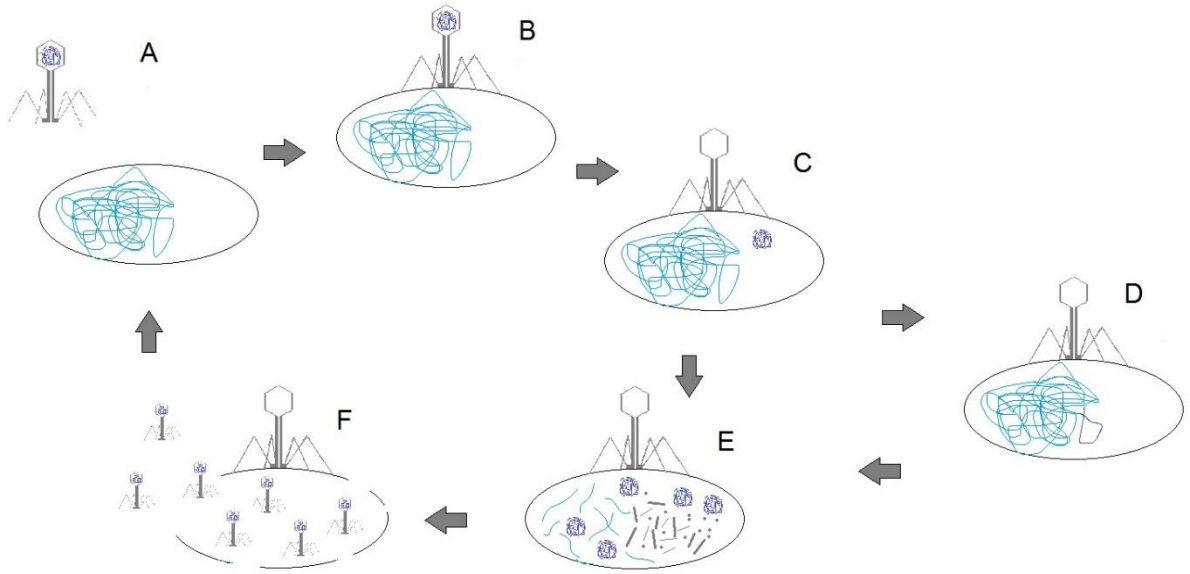


Figur 1: Generell anatomi av en bakteriofag.

Bakteriofager är antingen temperata eller lyserande. Temperata fager, också kallade lysogena, kan inkorporera sitt genetiska material i bakteriens kromosom, där de följer med vid celldelning och kan gå in i en lyserande cykel när rätt signaler kommer. Lyserande virus kan inte göra detta, utan replikerar sig omedelbart efter infektion. Strukturproteiner och andra byggstenar för viruspartiklarna produceras och monteras innan cellen lyserar (Figur 2). Fager som används i teraputiska syften är alltid lyserande, eftersom temperata fager kan ge resistens mot liknande virus, föra med sig bakteriellt DNA, t.ex. antibiotikaresistensgener, till nya värdar, och innehålla virulensfaktorer, som kan göra harmlösa bakterier patogena. (Endersen *et al.* 2014).

Bakteriecellens lysering medieras genom att viruskodade proteiner kallade holiner bildar porer i cellmembranet inifrån, genom vilka en annan typ av proteiner, kallade endolysiner,

kan passera. Dessa enzymer bryter ned peptidoglykanet i cellväggen så att cellen spricker (Chapot-Chartier 2014). Dessutom sker det ibland att bakterier lyserar när för många fager penetrerar cellen för injektion av sitt genetiska material. Cellväggen och cellmembranet försvagas av ett stort antal porer och lysering sker i förtid (Kazi & Annapure 2016).



Figur 2 Bakteriofagens livscykel. A; Fagen och bakterien existerar i närheten av varandra. B; Fagen fäster till bakteriens yta med hjälp av svansfibrer och basplatta. C; Fagens genetiska material injiceras i bakteriecellen. D; Endast i lysogena cykler: Fagen inkorporerar sina gener i bakteriens kromosom. E; Fagen replikerar sitt genetiska material och syntetiserar strukturella proteiner, enzymer, etc. Bakteriens DNA klipps sönder. F; Nya fagpartiklar monteras och bakteriecellen lyserar. Den infekterande fagens hölje kan sitta kvar på bakteriens yta efter att get genetiska materialet är inne i cellen, eftesom receptorerna kan binda mycket starkt. Bilden är inte skalenlig.

Eftersom bakteriofager inte har någon direkt effekt på eukaryota celler, av vilka människor är uppbyggda, lämpar de sig för medicinsk användning. De verkar dessutom inte ha några nämnvärda bieffekter på människor (Bruttin & Brüssow 2005, Sarker *et al.* 2012). Det finns dock vissa begränsningar för fagterapi i praktiken.

Problem med fagterapi

Det finns otroligt många bakteriofager, men alla är inte lämpliga för medicinska ändamål. De som fungerar bäst är de som lyserar celler och kan infektera många typer av bakterier. Det senare skapar problem, då fager som kan föröka sig effektivt i fler än en eller två arter är sällsynta. Ett annat problem är resistans, som har potential att utvecklas för många metoder att döda bakterier. Det finns många metoder för bakterier att bekämpa fager, bland annar CRISPR/Cas, restriktionsenzymer, EPS (extracellular polysaccharide substances), och mutationer eller blockerande molekyler i receptorer (Labrie *et al.* 2010, Nilsson 2014). Dessa begränsningar kan dock motverkas genom att tillämpa en cocktail av flera komplementerande fager. Tack vare den långa samevolutionen mellan bakterier och virus har fager utvecklat sätt att komma runt bakteriernas försvarssystem, och dessa kan användas för att motverka resistens, förutsatt att de kan hittas och användas.

Eftersom virus är betydligt större än antibiotikamolekyler kan det vara svårt att applicera en tillräckligt hög dos, om det inte sker direkt på den infekterade platsen, och de elimineras av kroppens immunförsvar om de appliceras intravenöst. Fager kan dock fortplanta sig i bakterier, vilket ökar deras antal varje gång en cell lyserar. När infekterade bakterier lyserar kan de dock släppa ut toxiner som finns i vissa bakteriers cytoplasma. Detta kan orsaka

inflammation och allergiska reaktioner, vilket bör undvikas (Nilsson 2014). I och med att immunförsvaret lär sig känna igen främmande partiklar så kommer behandling med samma fager flera gånger få sämre verkan, eller i värsta fall orsaka en anafylaktisk chock. Det kan dock avhjälpas något genom att använda andra fager eller modifiera de som fungerat förut, så att ytan ser annorlunda ut.

Utöver de rent biologiska utmaningarna för fagterapi finns det lagliga och samhälleliga sådana. Regler för utveckling av läkemedel kräver uttömmande test över flera år, vilket skulle behöva göras för varje individuell fag som kan tänkas användas för behandling på människor. Dessutom faller bakteriofager under biologiska läkemedel, vilket utökar kraven på test innan användning. Cooper och medförfattare (2016) beskriver situationen och föreslår ett antal potentiella lösningar, och anser att reglerna behöver ändras med avseende på fagterapi. Det finns även en brist på kunskap om bakteriofager hos allmänheten, så patienter kan vara motvilliga att tillåta behandling med virus, då ordet har många negativa konnotationer.

I detta arbete kommer jag utforska möjligheterna med fagterapi. Frågorna jag ska försöka besvara är, vad kan åstadkommas med fagterapi, och hur kan man styra vilka bakterier som påverkas av bakteriofager? För att besvara dessa frågor måste man dock förstå de mekanismer som styr bakteriofagers livscykel och de metoder som används för att manipulera dem.

Användning av bakteriofager

Behandling

Bakteriofager lämpar sig för behandling där antibiotika har låg verkan eller skulle störa naturliga processer, eller då resistens har uppkommit. Det kan dock vara svårt att behandla infektioner i kroppen där immunförsvaret lätt kan rensa ut virusen. Biofilm på till exempel brännsår, eller kroniska infektioner i mag-tarmkanalen lämpar sig därmed bättre för fagterapi än en bakterieinfektion i blodomloppet. Det kan också löna sig att använda mer än en fag, genom att designa en cocktail eller använda fagterapi i kombination med antibiotikabehandling kan öka effektiviteten av behandlingen markant.

Chadha och kollegor (2016) visade att fagterapi med enskild fag eller en cocktail kan hjälpa infekterade brännsår. De behandlade möss med brännsår infekterade med *Klebsiella pneumoniae* B5055 med fem olika fager ensamma och tillsammans, och kom fram till att fagterapi kunde slå ut bakterieinfektionen och hjälpa i läkningsprocessen på brännskadan. Behandling med fagcocktail hade särskilt bra verkan mot bakterierna.

Fagterapi har visats effektivt för behandling av MRSA, vilken är en farlig patogen för människor på grund av dess resistens mot antibiotika. Wang och kollegor (2016) identifierade en virulent fag med lovande egenskaper för fagterapi. Behandling med fagen minskade mängden *S. aureus* i lungor, mjälte och blod hos möss jämfört med kontrollgruppen. I ett försök på kaniner demonstrerade Kishor och kollegor (2016) att en cocktail av fager kan användas för att behandla osteomyelit, en inflammation eller infektion i benvävnad eller benmärg, orsakad av MRSA. Osteomyelit är svårbehandlat med antibiotika, eftersom benvävnad har dålig tillförsel av blod, vilket begränsar mängden antibiotika som når bakterierna, och det har en tendens att bildas biofilm, vilket reducerar effektiviteten av antibiotika. I detta försök behandlades kaniner 3 (n = 12) veckor efter infektion, efter 6 veckor (n = 12) eller inte alls (kontroll; n = 4). Alla 16 behandlade kaniner visade tecken på

återhämtning efter behandlingen, och de som fick fagcocktail efter 6 veckor observerades i 2 månader utan att bakterier detekterades (Kishor *et al.* 2016).

I ännu ett försök på möss behandlade Debarbieux och kollegor (2010) lunginfektioner av *Pseudomonas aeruginosa* med en fag. De tillsatte fagen intranasalt i intervall efter infektion, och fann att möss hade hög chans att överleva när fagen tillsattes 2 timmar efter infektion. Detta då bakterier delar sig snabbast under det tidiga stadiet av infektionen, och därmed är mest sårbara för fagangrepp. De testade även fagens effekt som förebyggande medel genom att tillsätta fager 24 timmar före bakterien. Alla förbehandlade möss (n = 4) överlevde experimentet, som varade 16 dagar, vilket är en stor skillnad mot kontrollgruppen, i vilken alla möss dog inom 2 dagar. De påpekar att de förebyggande egenskaperna av fagterapi kan ha möjligheter för att hindra epidemier och förebygga att vårdpersonal blir sjuka (Debarbieux *et al.* 2010). Man kan även tänka sig att fager kan sakta ner sjukdomsförloppet och ge immunförsvaret en större chans att bekämpa den infekterande bakterien.

Det har gjorts ett stort antal försök med fager på människor för att behandla sjukdomar som dysenteri, hudinfektioner och salmonella i Östeuropa (Sulakvelidze *et al.* 2001), men få av dessa har nått det internationella vetenskapliga samfundet. Det har dock gjorts ett fåtal försök nyligen där människor utsatts för fager i kliniska försök, och fler måste göras innan fagterapi kan få vidspridd tillämpning (Bruttin & Brüssow 2005, Sarker *et al.* 2012). Dessa utfördes på friska individer, så data från Västeuropa för hur väl fagterapi kan bota infektioner i människor saknas ännu.

Bruttin och Brüssow (2005) gjorde ett försök på människor för att se huruvida bakteriofager har några negativa effekter på människor när de tas upp oralt. De fann inga signifikanta effekter på försökspersonerna. I ett liknande försök av Sarker *et al.* (2012) testades en cocktail av 9 fager i 100-falt högre koncentration, jämfört med försöket av Bruttin och Brüssow (2005), på människor efter att ha analyserats för att undvika eventuella virulensgener eller andra negativa faktorer. De fann inte heller några tydliga negativa effekter från fagerna på människor. De fann ej heller någon effekt på tarmfloran hos försökspersonerna, trots att de detekterade fager i avföringen efter en högre dos. Mängden fager var dock mycket mindre än den som intogs, troligtvis på grund av att fagerna inte var utrustade för att överleva den sura miljön i magen (Sarker *et al.* 2012). Det borde dock vara möjligt att mikroenkapsulera fager så att en större andel överlever till tarmen, som gjordes i ett försök på svin av Zhang och kollegor (2010), beskrivet nedan.

Biofilm

Biofilm är bakterier som går ur celldelningsprocessen och aggregerar på en yta. De utsöndrar polysackarider som bildar en skyddande matris kallad EPS, vilket gör behandling svårt. Bakterierna förökar sig inte, så många antibiotika som attackerar celldelningsprocessen har ingen verkan. Virus kan fortfarande infektera bakterierna. Lagret av EPS kan dock fysiskt hindra fager från att komma åt cellerna. Detta problem kan lösas genom att modifiera fager så att de utsöndrar enzymer som bryter ned EPS (Motlagh *et al.* 2016), eller får värdbakterier att producera sådana enzymer under infektionen, vilka sedan frigörs vid lysering tillsammans med de nya viruspartiklarna (Lu & Collins 2007). Biofilm är inte bara ett medicinskt problem, utan kan bildas på industriella ytor såsom filter och rörliga delar i system under vatten.

Enterococcus faecalis är en naturlig tarmbakterie som ibland kan infektera tandhalsen opportunistiskt. Modifierade profager, d.v.s temperata fager, har visats effektiva för behandling av vancomycin-resistent *E. faecalis* i biofilm. Modifieringen gick ut på att göra en

temperat fag exklusivt lytisk genom att ta bort gener för lysogeni, och därmed göra den lämpad för fagterapi (Tinoco *et al.* 2016). Detta påvisar användningen av genmodifering som en väg till utökade möjligheter inom fagterapi.

Virus som hjälpmedel vid antibiotikabehandling
Bakteriofager kan användas som behandling själva, men de kan även fungera som hjälpmedel vid behandling med antibiotika. Lu och Collins (2009) visade att användning av genmanipulerade virus och antibiotika tillsammans ökade effektiviteten av behandling upp till tusenfalt (mätt i CFU, colony forming units) i kultur jämfört med endast antibiotika, och ökade chansen för överlevnad hos möss infekterade med *E. coli* markant. Detta gällde även för antibiotikaresistenta stammar, då fagerna kunde modifieras så att de störde bakteriernas försvarssystem.

I ett försök med fag T4 och antibiotikat cefotaxim, en β-laktam (inhiberar syntes av cellvägg) med brett spektrum, visade Ryan och kollegor (2012) att samverkan mellan virus of antibiotika kan förstärka effekten av båda på biofilm av *E. coli*. Högre dos av antibiotika ökade storleken på plack, och högre koncentration av virus minskade den nödvändiga koncentrationen av cefotaxim för att ta bort biofilm.

Dessa resultat stöds av en studie av Torres-Barceló och kollegor (2016), i vilken de undersökte den kombinerade effekten av fagen LKD16 och tre olika antibiotika på *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. De fann att kombinationsterapi hade högre effekt än endera behandling på egen hand över 7 dagar. De fann även att typen av antibiotika hade betydelse för hur framgångsrik behandlingen var, då karbenicillin hade högre synergistisk effekt än gentamicin och trimetoprim. De spekulerar att detta kan bero på hur fagens och antibiotikats mekanismer interagerar. Karbenicillin är en β-laktam, vilka inhiberar syntes av bakteriens cellvägg, gentamicin är aminoglykosid, vilka blockerar syntesen av proteiner av bakteriens ribosom, och trimetoprim är en sulfamid, vilka inhiberar nukleinsyrasyntes (Torres-Barceló *et al.* 2016). Hur dessa, och andra, mekanismer interagerar med fager bör studeras för att optimera effekten av kombinationsterapi, vilket kan koma att rädda liv.

En cocktail av virus kan förhindra att resistens uppkommer, och användning i kombination med antibiotika kan täcka eventuella ”blinda fläckar”(Dalmasso *et al.* 2016) och ge bättre resultat än endera kan på egen hand. Vissa mutationer kan ge resistens mot flera olika antibiotika, men korsresistens med virus är mycket osannolikt. Att fler mutationer krävs för bakteriens överlevnad gör det mindre sannolikt, och behandlingen har bättre verkan.

Manipulering av värdspektra

I många situationer kan det vara bra att modifiera vilka bakterier som påverkas av fagterapi. Det kan till exempel handla om flera olika patogena bakterier som lever tillsammans, eller en skadlig bakterie som lever bland mutualistiska bakterier. Man kan alltså vilja bli av med allt som lever på ett ställe, eller bara sikta in sig på en av många.

Breddning av värdspektrum
Det kan ibland krävas av en behandling att den klarar av att döda många olika bakterier, det vill säga att den teraputiska fagen har ett brett spektrum av värdorganismer. Detta kan åstadkommas genom att ta ett prov från en miljö där virus med önskade egenskaper väntas finnas, och odla dem på ett antal olika bakterier i följd. Plack från den första bakterien odlas på nästa, och så vidare, tills man har ett eller flera virus som kan föröka sig i alla de bakterier

man vill behandla (Ross *et al.* 2016). Detta behöver inte sluta med att man bara har en typ av fag i slutet. Man börjar med allt som finns i provet och gör sig successivt av med det som inte fungerar på det sätt man önskar, vilket kan lämna ett antal virus med breda infektionsspektra. Denna metod kan vara användbar för att ta fram fager för en standardiserad cocktail som kan användas på de vanligaste bakteriella infektionerna i en region.

Det går även att genmanipulera fager så att de får ett bredare värdspektrum. Man kan ta gener för svansfibrerna från ett virus som kan infektera många bakterier, och sätta dem i en fag med bra lytiska, reproduktiva, eller andra önskade egenskaper (Mahichi *et al.* 2009). Toppen på fibrerna binder till molekyler på bakteriens yta, vilket är det första steget av infektion, före injicering av det genetiska materialet. Kimära fager, dvs fager som består av kombinerade delar från flera olika virus, är en möjlighet för att skräddarsy behandlingar. Om tid inte är en faktor, till exempel vid kroniska infektioner, skulle det gå att bygga en eller flera fager med optimerade attribut för just det fallet, vilket i sinom tid kan skapa ett bibliotek av virus för specifika behandlingar.

Man har dokumenterat mutationer som kan öka bakteriofagers värdspektrum (Tétart *et al.* 1996). Om dessa kan studeras tillräckligt borde man kunna jämföra nyupptäckta fagers gener med kända sekvenser, och använda datorsimuleringar för att förutsäga vilka bakterier de kan infektera. Det går även att använda bakteriofager för att screena för virulens hos bakterier, då vissa fager använder virulensfaktorer på bakteriens yta som receptorer (Orndorff 2016). Sådana fager bör kunna användas för att behandla patogena stammar av normalt mutualistiska bakterier.

Fagterapi i livsmedelsindustrin

Det är inte bara i medicinska sammanhang fagterapi kan ha möjligheter. Liksom antibiotika kan det ha användningar inom andra områden, till exempel inom djuruppfödning. I ett experiment på svin visade Wall med kollegor (2010) att fagterapi kan användas för att behandla *Salmonella enterica* i djur som infekterats under transport och hållning före slakt. De tog fram en cocktail av fager som visades effektiva mot *S. enterica* Typhimurium, och behadlade sedan infekterade svin med blandningen. Analys visade att det fanns färre bakterier i tarm och tonsiller jämfört med kontroll hos behandlade svin.

I ett uppföljande försök tog de fram ännu en cocktail i syfte att bredda effekten till andra serotyper av *S. enterica.* De isolerade tjugo typer av bakteriofag från prov tagna i vattenreningsverk och testade dem på *S. enterica* Typhimurium, *S. enterica* Enteritidis och *S. enterica* Kentucky. Utav dessa valdes 10 fager ut och användes i en cocktail med hög lytisk verksamhet på en blandning av de tre serotyperna. Dessutom mikroenkapsulerades virusen i de resulterande blandningarna, vilket gav en minskad reduktion i PFU (plaque forming units) i en period på upp till 14 dagar i rumstemperatur. Detta för att hjälpa fagerna överleva den hårda miljön i mag-tarmkanalen, och därmed underlätta oral administrering. De föreslår att sådana cocktails kan levereras med foder eller vatten till boskap, och sprejas på djurets hud innan slakt för att undvika kontaminering av köttet (Zhang *et al.* 2010).

Liknande försök har gjorts på höns, nötkreatur och får i avsikt att behandla vanliga patogena bakterier, med lovande resultat. Fager har även visats kunna reducera antalet bakterier på kött, fisk, musslor, färsk frukt och grönsaker och i färdiga rätter, samt för att förhindra att mat blir dålig (Endersen *et al.* 2014, Galarce *et al.* 2014, Kazi & Annapure 2016, Pereira *et al.* 2017). Detta är fördelaktigt för fältet, eftersom det finns ett kommersiellt intresse för bakteriofager,

utöver det rent medicinska, vilket kan komma att underlätta den ekonomiska situationen för forskare.

Minskning av värdspektrum

Det kan ibland vara bra att bara attackera en specifik bakterie, till exempel om infektionen sker i mag-tarmkanalen, där användning av antibiotika kan störa balansen av mikroorganismer, vilket kan orsaka obehagliga sidoeffekter. Bakteriofager är ofta väldigt specifika som vildtyp, så modifiering för att öka specificiteten är ofta inte nödvändigt. Om det behövs kan dock fager designas för högre specificitet som genmodifierade konstrukt. Till exempel kan CRISPR/Cas levereras med hjälp av virus, och designas så att det bara dödar skadliga bakterier, genom att attackera specifika mutationer eller virulensgener (Citorik *et al.* 2014).

CRISPR/Cas binder till specifika DNA-sekvenser med hjälp av matchande RNA bundet till ett protein, men det går att göra fager specifika på andra sätt. Proteinerna som binder till bakteriens yta kan modifieras för att bestämma vilka bakterier som över huvud taget kan infekteras. Svansfibrer från specialiserade fager kan användas för att få viruset att bara infektera vissa bakterier, och virusets gener kan anpassas så att bara vissa av de infekterade cellerna dör. Man kan flera lager av selektion på det viset. Om till exempel antibiotikaresistens uppkommer i en ofarlig bakterie som är infekterad med ett virus som bara dödar resistenta celler, så motverkas resistens i populationen. För att det ska fungera måste man dock förutsäga mutationer som sannolikt kan resultera i resistens mot antibiotika.

Syntetisk biologi

Framsteg inom bioteknik, och framför allt syntetisk biologi, har skapat intressanta möjligheter för fagterapi. Virus kan modifieras för att få bredare eller smalare värdspektrum, anpassas för att samarbeta i en cocktail, och få speciella egenskaper, till exempel extra hög effektivitet mot antibiotikaresistenta bakterier. Det senare skulle kunna göras med särskilda mutationer i adsorbtionsproteiner, då antibiotikaresistens ibland orsakas av mutationer i kanalproteiner som transporterar antibiotika ut ur cellen, och dessa kanalproteiner kan agera som receptorer för fagens svansfibrer.

Syntetisk biologi omfattar ett antal metoder för att konstruera nya funktioner för levande organismer, biologiska makromolekyler, eller system av dessa. Detta görs ofta genom rekombination av DNA för att skapa nya kombinationer av proteiner som kan arbeta tillsammans, eller modifiera proteiner så att de får nya eller förbättrade funktioner.

Med tanke på diversiteten av adsorbtionsmekanismer hos fager (Silva *et al.* 2016), borde det gå att designa fager så att de kan infektera fler, eller färre, bakterier. Med ett bibliotek av svansfibrer och ett index över korresponderande receptorer, samt ett enkelt test för att se vilka av dessa som finns hos en viss bakterie, t.ex. med hjälp av antikroppar, skulle det gå att anpassa fagterapi för enskilda fall och motverka eller förebygga resistens i en infektion. Med större förståelse för hur fager adsorberar till bakterier kan man även designa bättre cocktails för behandlingar.

Virus kan modifieras så att de kan replikera i bakterier som normalt kan bekämpa dem genom att sätta in gener från fager bakterien har sämre försvar mot (Lu & Collins 2007). Vissa modifierade virus lyserar inte celler de har infekterat, utan dödar dem på annat sätt. Viruslevererat CRISPR/Cas är ett exempel, då det kan klippa sönder bakteriens kromosom och orsaka celldöd. Celldöd utan lysering kan vara fördelaktigt, då bakterier kan innehålla

toxiner som orsakar inflammation och andra immunreaktioner om de frigörs i kroppen (Nobrega *et al.* 2015). När fager inte förökar sig i bakterien måste man dock tillsätta mer från början, eftersom de inte fylls på av naturlig förökning. Det kan till och med behövas flera doser i sådana fall, om koncentrationen inte går att få tillräckligt hög från början. En av fördelarna med fagterapi är att fager normalt förökar sig i bakterier, vilket gör att det inte behövs en alltför stor dos då mängden virus ökar efter hand. Utan denna egenskap kan behandlingen försvåras.

Metoder som MAGE (multiplex automated genome engineering) kan tänkas vara användbara för att öka effektiviteten av virus. MAGE använder cykler av elektroporering, återhämtning och tillväxt för att transformera korta, enkelsträngade DNA-bitar kallade oligonukleotider in i bakterier. Metoden kan användas för att introducera många mutationer i ett genom med hög specificitet och pålitlighet, eftersom oligonukleotiderna kan designas att vara homologa med målbakteriens genom utom på en eller ett fåtal kvävebaser. Resultatet är en mängd mutationer i endast önskade gener som sedan kan screenas för förbättrade egenskaper (Wang HH *et al.* 2009). Om detta kan appliceras på fager borde man kunna utveckla enormt förbättrade egenskaper i adsorbtion, infektering, lysering, överlevnad utanför cellen, etc. Dessutom borde MAGE kunna användas för att accelerera fagers evolution när bakterier oundvikligen utvecklar resistens mot dem.

Det finns användningar för modifierade fager utöver behandling av bakteriella infektioner. De kan användas som leverans för vaccin, antingen genom att lägga till peptider på proteinhöljet som kan kännas igen av immunsystemet, eller genom DNA-vaccin, där gener i viruset kodar för peptider som uttrycks i celler hos däggdjur, vilka presenteras för immunförsvaret av de påverkade cellerna. Bakteriofager kan modifieras så att de får förmågan att infektera eukaryota celler genom att kombinera en fag med virus som har eukaryota värdorganismer. Detta har använts, utöver vaccinleveransen nämnd ovan, för att leverera gener som inhiberar tillväxten hos tumörer. (Barbu *et al.* 2016).

Diskussion

Fagterapi är ett till synes effektivt alternativ till antibiotika. Fager kan lätt samlas upp och renas från en mängd källor, och är ofta specifika för en bakterieart eller -stam, vilket gör dem lämpliga för behandling av infektioner. De verkar dessutom inte ha några direkta bieffekter på ryggradsdjur, annat än en immunreaktion om dosen är tillräckligt hög och på en plats i kroppen där immunsystemet kan komma åt dem. Eftersom fager är specifika för bakterier, och ofta har väldigt smalt värdspektrum, kan de inte infektera mänskliga celler, eller göra någon skada om de på något sätt skulle lyckas. De kan dock kombineras och modifieras så att de kan infektera fler typer av bakterier, och till och med skilja mellan patogena och ofarliga varianter av samma bakterieart.

Med växande kunskap om hur biologiska system interagerar med varandra och hur dessa interaktioner kan manipuleras, ökar användningen av komplexa läkemedel, av vilka fager endast är ett exempel. Bristen på kunskap var en anledning till att fagterapi i stort sett glömdes bort i väst sedan antibiotika upptäcktes. Idag kan man dock studera molekylära funktioner i detalj, och basera experiment på dessa observationer. Makromolekylära interaktioner som svansfibrernas bindning till molekyler på bakteriens yta kan vara avgörande för huruvida en behandling är framgångsrik, och utan sådan förståelse skulle det i stort sett vara slumpen som avgjorde. Med dagens kunskap kan man dock designa skräddarsydda virus på en genetisk nivå, och förutsäga vilka bakterier som kommer att påverkas, och hur.

Eftersom bakteriofager, enligt vissa definitioner, är levande organismer och evolverar kontinuerligt så lämpar de sig för den kapprustning som sker hela tiden gentemot bakterier. När bakterier utvecklar resistens mot ett antimikrobiellt medel så byter vi till ett annat, och de börjar anpassa sig igen. Med fager anpassar sig dock vårt verktyg mot bakterierna samtidigt som de evolverar resistens, något som inte går med antibiotika. Specifika molekyler måste modifieras manuellt eller bytas ut helt, medan bakteriofager muterar i takt med sin värd och utvecklar mekanismer för att komma runt resistens på egen hand. Denna fördel kan dock betyda att vi inte hinner med i karaktäriseringen av nya virus, och ger möjligheter för virulensfaktorer att uppkomma vilket kan få katastrofala följder.

Även om det gjorts uttömmande tester på människor i länder som Polen och före detta Sovjetunionen krävs det ytterligare tester nu, då denna litteratur ofta inte finns tillgänglig och ej är skriven på engelska, och dessutom ofta inte har lika strikta krav på sig som idag (Sulakvelidze *et al.* 2001). Studier på långsiktiga effekter bör göras i länder där fager redan är lättillgängliga och har använts i årtionden, så att säkerheten och effektiviteten kan fastställas för åtminstone de fager som redan används kommersiellt.

De fager som används är dock som regel isolerade från prov, det vill säga att de existerar naturligt. Modifierade fager, å andra sidan, bör studeras grundligt innan de används medicinskt eller kommersiellt. Eftersom de ej har evolverat naturligt kan de ha oanade effekter, både på patienter och ekosystem. Deras effekt bör studeras inte bara i isolerade kulturer, men även i mikrokosmos som simulerar naturliga miljöer, för att se om någon negativ effekt kan observeras. Detta är särskilt viktigt om syftet med modifikationen är att bredda fagens värdspektrum, då detta kan tänkas påverka flera olika bakteriearter, vilket ökar möjligheterna för konsekvenser på ekosystemnivå. Sådana fager skulle dock vara användbara för fagterapi, då de skulle ha möjlighet att användas för många typer av infektioner.

Bakteriofager har alltså potential för medicinsk användning, men det finns även andra områden där fager kan användas. Till exempel kan de användas för att förebygga kontaminering av livsmedel och rena biofilm från ytor i industriella processer, såsom filtrering. Det verkar som om fagterapi har kommit för att stanna den här gången.

Vad kan göras i framtiden?
Det verkar som om fagterapi har en plats i framtidens medicinska verksamheter, så länge man kan komma runt de farmakologiska och lagliga begränsningarna som existerar idag. Med de lovande resultat som redan finns för fagterapi är det dock inte ett alltför stort steg att undra huruvida liknande metoder kan användas för icke-bakteriella infektioner, till exempel av svamp eller parasiter. Virus som biokontroll skulle kunna motverka svampinfektioner på grödor, vilka kan orsaka stora skador på spannmål.

Om fagterapi börjar användas på stor skala behöver man dock tänka igenom alla möjligheter, och förbereda för de värsta. Man bör undersöka huruvida genmodifierade virus kan ha någon effekt på ekosystemet om de skulle komma ut, och om bekämpning av vissa bakterier kan låta andra ta deras plats som viktiga patogener. Som biolog måste man i hög grad vara medveten av de etiska konsekvenserna av sitt arbete då det, i vissa fall bokstavligt talat, kan få eget liv.

Referenser

Barbu EM, Cady KC, Hubby B. 2016. Phage Therapy in the Era of Synthetic Biology. ResearchGate a023879.
Bruttin A, Brüssow H. 2005. Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 2874–2878.
Chadha P, Katare OP, Chhibber S. 2016. In vivo efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice. Microbial Pathogenesis 99: 68–77.
Chapot-Chartier M-P. 2014. Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. Frontiers in Microbiology, doi 10.3389/fmicb.2014.00236.
Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. 2014. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nature Biotechnology 32: 1141–1145.
Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. 2016. Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy 1209.
Dalmasso M, Strain R, Neve H, Franz CMAP, Cousin FJ, Ross RP, Hill C. 2016. Three New Escherichia coli Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. PLOS ONE 11: e0156773.
Davies J, Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74: 417–433.
Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L. 2010. Bacteriophages Can Treat and Prevent Pseudomonas aeruginosa Lung Infections. Journal of Infectious Diseases 201: 1096–1104.
Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A. 2014. Phage Therapy in the Food Industry. Annual Review of Food Science and Technology 5: 327–349.
Galarce NE, Bravo JL, Robeson JP, Borie CF. 2014. Bacteriophage cocktail reduces Salmonella enterica serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues. Revista Argentina de Microbiología 46: 333–337.
Kazi M, Annapure US. 2016. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. Journal of Food Science and Technology 53: 1355–1362.
Kishor C, Mishra RR, Saraf SK, Kumar M, Srivastav AK, Nath G. 2016. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. Indian Journal of Medical Research 143: 87.
Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews Microbiology 8: 317–327.
Lu TK, Collins JJ. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 11197–11202.
Lu TK, Collins JJ. 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 4629–4634.
Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T, Tanji Y. 2009. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. FEMS Microbiology Letters 295: 211–217.
Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R. 2016. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32: 67.
Nilsson AS. 2014. Phage therapy—constraints and possibilities. Upsala Journal of Medical Sciences 119: 192–198.
Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. Trends in Microbiology 23: 185–191.

Orndorff PE. 2016. Use of bacteriophage to target bacterial surface structures required for virulence: a systematic search for antibiotic alternatives. Current Genetics 62: 753–757.

Pereira C, Moreirinha C, Teles L, Rocha RJM, Calado R, Romalde JL, Nunes ML, Almeida A. 2017. Application of phage therapy during bivalve depuration improves Escherichia coli decontamination. Food Microbiology 61: 102–112.

Pines G, Freed EF, Winkler JD, Gill RT. 2015. Bacterial Recombineering: Genome Engineering via Phage-Based Homologous Recombination. ACS Synthetic Biology 4: 1176–1185.

Ross A, Ward S, Hyman P. 2016. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. Frontiers in Microbiology, doi 10.3389/fmicb.2016.01352.

Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. 2012. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of Escherichia coli biofilms in vitro. FEMS Immunology & Medical Microbiology 65: 395–398.

Sarker SA, McCallin S, Barretto C, Berger B, Pittet A-C, Sultana S, Krause L, Huq S, Bibiloni R, Bruttin A, Reuteler G, Brüssow H. 2012. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. Virology 434: 222–232.

Silva JB, Storms Z, Sauvageau D. 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. FEMS Microbiology Letters 363: fnw002.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. 2001. Bacteriophage Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 649–659.

Tinoco JM, Buttaro B, Zhang H, Liss N, Sassone L, Stevens R. 2016. Effect of a genetically engineered bacteriophage on Enterococcus faecalis biofilms. Archives of Oral Biology 71: 80–86.

Torres-Barceló C, Franzon B, Vasse M, Hochberg ME. 2016. Long-term effects of single and combined introductions of antibiotics and bacteriophages on populations of Pseudomonas aeruginosa. Evolutionary Applications 9: 583–595.

Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD. 2010. Phage Therapy To Reduce Preprocessing Salmonella Infections in Market-Weight Swine. Applied and Environmental Microbiology 76: 48–53.

Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. 2009. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature 460: 894–898.

Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J. 2016. SLPW: A Virulent Bacteriophage Targeting Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus In vitro and In vivo. Frontiers in Microbiology, doi 10.3389/fmicb.2016.00934.

Zhang J, Kraft BL, Pan Y, Wall SK, Saez AC, Ebner PD. 2010. Development of an Anti-Salmonella Phage Cocktail with Increased Host Range. Foodborne Pathogens and Disease 7: 1415–1419.

[Användning och möjligheter för bakteriofagterapi]: Etisk bilaga

Björn Greijer

Självständigt arbete i biologi 2016

Ska man använda genmanipulerade bakteriofager i medicinska sammanhang?

Genmanipulerade organismer är ett hett ämne i dagens sammhälle. Diskussionen handlar mest om livsmedel, men då fagterapi har börjat användas, och dess effektivitet kan ökas genom genetisk modifiering bör man diskutera huruvida genmanipulering bör användas för medicinska syften. Detta är ämnet som behandlas i denna etikbilaga.

För

De argument som talar för genmanipulerade fager för teraputiska ändamål är som följer: De fungerar bättre; fager kan modifieras för att få högre effekt mot bakterier och skräddarsys för särskilt svåra fall. Modifiering kan tillåta upprepade behandlingar med liknande fager, då immunförsvaret troligtvis kommer att känna igen de som använts förr. Fager har inga kända bieffekter; Eftersom fager inte påverkar mänskliga celler så har de inga negativa effekter på patienten utöver eventuella immunreaktioner till viruspartiklar eller lyserade celler, och det finns ingen anledning till att genmanipulering skulle ändra detta.

Mot

De argument som talar emot genmanipulering i fagterapi är följande: Vissa anser att det är fel att använda genmanipulering över huvud taget; det kan finnas religösa eller andra anledningar att säga nej till genmanipulering, till exempel att vi inte har rätt att ändra det naturen har skapat. Modifierade fager kan ha okända egenskaper; man förstår ännu inte exakt hur alla biologiska komponenter interagerar, och om man modifierar dessa kan det få oanade konsekvenser på både kort och lång sikt. Dessutom vet man inte hur genetiskt modifierade fager skulle påverka miljön om de kom ut; eftersom syftet med att modifiera fager för medicinska syften är att göra dem bättre på att döda bakterier skulle de kunna ha stora konsekvenser för bakteriefloran om de kom ut i naturen.

Diskussion

Fagterapi har definitivt potential för att behandla bakteriella infektioner, särskilt som antibiotikaresistens blir allt vanligare. Huruvida man bör modifiera dem kan dock diskuteras. Min åsikt är att genmanipulerade fager bör tillåtas medicinskt. Ökad effektivitet, specificitet, bredd, etc. kommer att gynna patienter enormt med få, om några, bieffekter. För att bemöta det första motargumentet så kan åsikten hos allmänheten ändras med utbildning och populärvetenskap samt exempel på lyckade behandlingar. För det andra motargumentet så görs uttömmande tester innan nya mediciner får användas, och det finns strikta regler för utveckling av gennmodifierade organismer och biologiska läkemedel. För miljöfrågan finns det redundans i naturen, och bakterier evolverar kontinuerligt. Även om fagen är väldigt effektiv på att döda bakterier är det sannolikt att resistens uppkommer, eller att nischen fylls om en viss bakterie dör ut lokalt.

Forskningsetik

Källorna som använts för arbetet är primära publikationer och reviewartiklar från vetenskapliga tidsskrifter. Jag har tagit med flera olika aspekter av fagterapi, men eftersom forskningen på det är relativt ny så finns det en brist på information om långsiktiga effekter och eventuell miljöpåverkan. Jag har försökt skilja mellan egna och andras slutsatser i texten, och har citerat publicerade försök och slutsatser.