UPPSALA
UNIVERSITET

Bakteriofager och antibakteriella peptider som ersättning till antibiotika

Karin Vickberg

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

Bakteriofager och antibakteriella peptider som ersättning till antibiotika

Karin Vickberg

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Under de senaste årtiondena har antibiotikaresistens hos bakterier eskalerat som följd av oförsiktig användning av antibiotika. När ett antibiotikum kommer ut på marknaden idag utvecklas resistenser mot det i princip direkt. Detta kommer att innebära stora problem för att bota virulenta bakterieinfektioner i framtiden. För att lösa detta problem måste man komma på alternativ till antibiotika, innan de blivit totalt ineffektiva. På senare år har man upptäckt att bakteriofager och antibakteriella peptider potentiellt kan användas som ersättande medel.

Man har hittills forskat mycket på bakteriofager och man använder dem på olika sätt, bland annat genom att angripa biofilmer, att angripa speciella pumpar som finns i bakteriernas cellmembran eller att leverera speciella DNA-sekvenser till cellerna som senare blir utsatta för bakterieinfektion. Det har visat sig att de bakteriofager som används för att angripa biofilmer inte kan utrota de multiresistenta bakterierna helt, vilket tyder på att bakteriofager kanske inte är det bästa medlet för att bekämpa just biofilmer. När bakteriofager istället angriper pumpar i membran eller levererar DNA-sekvenser verkar de däremot utrota bakterierna väldigt effektivt. I det fall där bakteriofagerna angriper pumpar kan antibiotika användas för att döda bakterierna om bakteriofagresistens utvecklas hos dem, vilket innebär att bakterierna dör oavsett om de är resistenta mot antibiotika eller bakteriofager.

Forskningen kring de antibakteriella peptiderna har inte kommit lika långt, jämfört med forskningen på bakteriofager. Av den forskning som hittills gjorts har man sett att bland annat en peptid vid namn CM11, lipopeptider och peptider som innehåller en hög halt av aminosyran Prolin (så kallade PrAMPs) kan ha antibakteriella aktiviteter. Dessa peptider dödar bakterierna genom att antingen angripa cellmembranet eller ribosomer i cellen. Lipopeptider har visat sig vara mest effektiva mot gram-positiva bakterier, medan CM11 kan attackera både gram-positiva och gram-negativa bakterier. Man har upptäckt att PrAMPs kan ta sig igenom blod-hjärnbarriären, vilket gör det potentiellt möjligt för dem att bota infektioner i hjärnan.

Inledning

Antibiotika är bakteriedödande kemikalier som bland annat används för att behandla virulenta infektioner. De upptäcktes som naturliga produkter i till exempel svampar där de agerar som ett kemiskt försvar. Svamparna försvarar sig genom att frigöra antibiotika till den omgivande miljön, vilket dödar andra mikroorganismer (bland annat bakterier). På så sätt försvarar svamparna sig och ökar sannolikheten för att överleva (Walsh 2000). Det första antibiotikumet; Penicillin, upptäcktes på 1920-talet. Ända sedan dess har det använts som ett läkemedel (Tawil *et al.* 2014). Antibiotika har dock inte bara använts som läkemedel, utan också inom köttindustrin för att förhindra sjukdom och öka tillväxt (Potera 2013). Efter upptäckten av Penicillin har det tillkommit ytterligare antibiotika och dessa har senare delats in i olika grupper, bland annat quinoloner, rifamyciner, β-laktamer och glykopeptider. Grupperna attackerar olika delar av cellerna de angriper. Quinoloner orsakar bland annat DNA-skador vilket inhiberar DNA-syntes, och som konsekvens kan inte celldelning ske.

Rifamyciner attackerar RNA, medan β-laktamer och glykopeptider bryter ned cellväggen. Det finns även många antibiotika som attackerar olika proteiner i cellen (Tawil *et al.* 2014).

Redan på 1940-talet, ungefär två årtionden efter att det första antibiotikumet Penicillin hade upptäckts, fann man att bakterier hade utvecklat en resistens mot antibiotikumet (Woon & Fisher 2016). Detta innebär att de kan överleva och föröka sig trots att antibiotika finns närvarande. Resistensen kan uppkomma på olika sätt, till exempel genom mutationer eller horisontell genöverföring (gener överförs mellan bakterier av samma stam), och ärvs oftast från generation till generation (Tawil *et al.* 2014). Bakterierna som utvecklat resistens kommer med större sannolikhet att överleva i en miljö där antibiotika kan finnas närvarande, vilket leder till att dessa bakterier selekteras framför andra bakterier och kommer därmed att dominera populationen (Walsh 2000). I de fall där antibiotika använts inom köttindustrin har en sådan här typ av selektion skett, eftersom kemikalierna har spolats med avlopp och hamnat i grundvattnet. I grundvattnet selekterar antibiotika för bakterier som utvecklat resistens mot just dessa antibiotika (Potera 2013). Ursprungligen uppkom antibiotikaresistens naturligt, men på sistone har den spridits som en konsekvens av oförsiktig användning av antibiotika. Ibland skrivs antibiotika ut till patienter vars infektioner i själva verket inte behöver behandlas med antibiotika, och på så sätt har antibiotika överanvänts. Oförsiktig antibiotikaanvändning har alltså selekterat för de resistenta bakterierna (Chan *et al.* 2016).

Resistenta bakterier har visat sig bli en allt vanligare orsak till infektioner hos människor. För att bota dessa sjukdomar väljer man ofta att utnyttja ett annat antibiotikum som man hoppas att bakterien inte är resistent mot. Problemet är dock att en bakterie kan utveckla resistens mot flera antibiotika, så kallade multiresistenta bakterier. Detta försvårar behandlingen. För att lösa detta problem letar man ständigt efter nya antibiotika, samt försöker utveckla nya genom att modifiera redan befintliga (Gordon *et al.* 2005). De senaste 30 åren har dock denna utveckling avstannat, medan man har noterat en markant ökning av antibiotikaresistens hos bakterier (Li *et al.* 2006). Resistensökningen ses som ett stort hälsoproblem i och med den försvårade behandlingen (Kutateladze & Adamia 2010).

Den vanligaste multiresistenta bakterien kallas MRSA (Meticillin-resistent *Staphylococcus aureus*), vilken kan hittas på sjukhus över hela världen. MRSA leder ofta till bland annat infektioner i blodomloppet och öppna hud- och sårinfektioner, vilket gör att de lätt sprids vidare och orsakar ytterligare infektioner (Rao 1998, Tawil *et al.* 2014). Faktum är att infektionsspridningen som sker i samhället är ett växande problem och beror främst på bristande hygienrutiner, vilket också är den främsta orsaken för smittspridning på sjukhus (Rao 1998, Cosgrove *et al.* 2003). Det finns olika stammar av *S. aureus*, varav MRSA är en. Andelen MRSA av den totala mängden *S. aureus* har mätts i olika länder, och har visat sig vara störst i länder som USA, Taiwan, Japan och Hong Kong. Andelen MRSA kan dock vara hög även i Europa, till exempel i Rumänien där MRSA utgör drygt 60 % av alla *S. aureus* bakterier, jämfört med Sveriges ynka 1 % (Gould 2007). Detta innebär i Sveriges fall 45 rapporterade MRSA-fall under perioden 2005-2014 (Lindgren *et al.* 2016). Enligt en sammanställande studie av Cosgrove med kollegor (2013) av 31 andra studier dör upp till 83,3 % av de patienter som smittats med MRSA. Författarna nämner att justeringar har gjorts i de fall där patienterna varit svårt sjuka och kan ha avlidit av andra skäl än MRSA. Trots dessa justeringar kan alltså dödsfrekvensen vara väldigt hög (Cosgrove *et al.* 2003). I Sverige har vi inte ännu många dödsfall, men i länder som Rumänien eller ännu mer extrema Taiwan där betydligt fler blir smittade med MRSA, är dödsantalen högre (Gould 2007, Lindgren *et al.* 2016). Att hitta alternativa botemedel för antibiotika är därför viktigt för bekämpning av MRSA-bakterier och andra multiresistenta bakterier som leder till allvarliga sjukdomar.

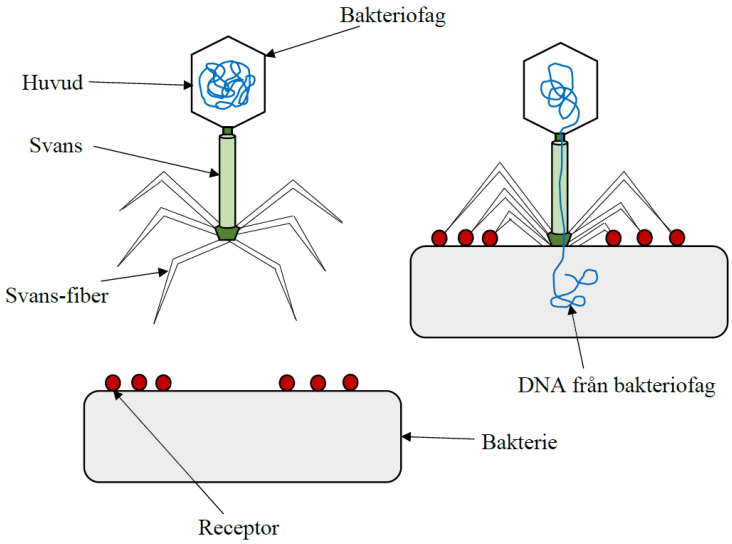
Idag utvecklar bakterier resistenser mot nya antibiotika rekordsnabbt. Man har upptäckt att bakterier till och med har blivit resistenta mot de allra nyaste antibiotika. Dessa bakterier är ofta resistenta mot samtliga antibiotika som är kända idag (så kallade PDR-bakterier), och deras infektioner blir därmed väldigt svårbehandlade (Chan *et al.* 2016). Ett antibiotikum som kallas Carbapenem har man dock varit varsam med och sparat som en sista utväg för att bekämpa de bakterier som blivit resistenta mot alla andra antibiotika. Trots detta har man hittat bakterier som även blivit resistenta mot Carbapenem. Dessa bakterier anses vara resistenta mot samtliga tillgängliga antimirkobiella medel (Bratu *et al.* 2005).

I och med att mycket få antibiotika är på gång att utvecklas kommer multiresistenta bakterier att behöva bemötas genom alternativa metoder i framtiden. I annat fall kommer det innebära ett stort problem att bota infektioner som är orsakade av dessa resistenta bakterier. På senare år har man försökt hitta alternativa medel som kan ersätta antibiotikaanvändningen, bland annat predatoriska bakterier (t.ex. *Bdellovibrio bacteriocorus*, som attackerar och dödar andra bakterier), genförändrande enzymer, bakteriofager (bakteriella virus) och antibakteriella peptider (små proteiner som har en antibakteriell verkan) (Reardon 2015). I denna rapport fokuseras det huvudsakligen på metoderna som innefattar bakteriofager eller antibakteriella peptider. Målet med rapporten är att redovisa hur forskningen ligger till rörande dessa alternativa behandlingsmetoder.

Bakgrundsfakta om bakteriofager

Bakteriofager (vanligtvis kallade fager) upptäcktes i början av 1900-talet av Frederick Twort och Félix d'Herelle (Twort 1915, d'Herelle 1917). Då bakteriofager agerar som bakteriella virus har de betytt otroligt mycket för vetenskaplig utveckling och förståelse för forskningsområden såsom molekylärbiologi och bakteriers genetik (Nobrega *et al.* 2015). Likt andra virus angriper bakteriofager celler och utnyttjar deras maskineri för att göra många kopior av sig själv. Detta får till slut bakteriecellen att explodera, vilket leder till att bakterien dör och det stora antal bakteriofager som producerats inuti cellen sprids till den omgivande miljön (Tawil *et al.* 2014).

Det finns oerhört många arter av bakteriofager, vilka skiljer sig i såväl struktur som uppbyggnad. Generellt sett kan man beskriva en bakteriofag som ett virus bestående av ett huvud, en svans och svans-fibrer (utstickande "ben" från svansen) (Figur 1). I huvudet finns bland annat bakteriofagens DNA, vilket ofta har spår av bakteriellt DNA från tidigare interaktioner med andra bakterier. Olika bakteriofag-arter finns spridda över hela vårt ekosystem och kan exempelvis hittas i inälvor såsom tarmen. Gemensamt för arterna är att de är specifika för sin värd. Detta gör att man kan använda



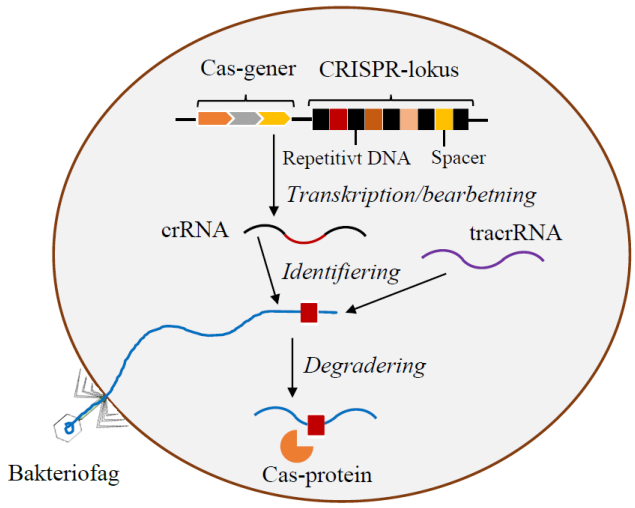
Figur 1 – Bakteriofag som infekterar en bakterie. Figuren visar en bakteriofag, vilken generellt sett består av ett huvud, en svans och svans-fibrer. På bakterien finns receptorer som bakteriofagens svans-fibrer fäster till. Därefter sprutar bakteriofagen in sitt DNA i bakterien. Omritad efter Nobrega *et al.* (2015).

bakteriofager som potentiella läkemedel, eftersom man selektivt kan angripa en väldigt artegen bakteriestam (Tawil *et al.* 2014).

Bakteriofager kan attackera både gram-positiva och gram-negativa bakterier. Interaktionen sker genom att svans-fibrerna fäster till receptorer på bakteriens yta, varefter bakteriofagens DNA sprutas in i bakterien (Figur 1). Eftersom både svans-fibrerna och receptorerna på bakteriens yta varierar finns en otrolig specificitet mellan bakteriofag och bakterie (Tawil *et al.* 2014). I och med att bakteriofager är värdspecifika har man kommit fram till att man kan använda dem som ett alternativ till antibiotika. De kan då både användas helt utan tillsats av antibiotika, eller i kombination med antibiotikabehandling (Tait *et al.* 2002).

Försvarssystem hos bakterier

Något som försvårar användningen av bakteriofager som läkemedel är olika försvarsmekanismer som finns i bakterier. Bakterier har nämligen olika sätt att försvara sig på mot främmande DNA från till exempel virus eller plasmider. Dessa försvarsmekanismer har existerat under många miljarder år, men det är först på sistone som vi har upptäckt och utforskat systemen. Ett exempel på en försvarsmekanism är CRISPR-Cas systemen som finns lagrade på bakteriens kromosom. CRISPR-Cas system utgörs av CRISPR-lokus, vilket består av repetitiva DNA-sekvenser som inramar korta s.k. spacer-sekvenser (Figur 2). Dessa spacer-sekvenser är sparade kopior av främmande DNA-fragment som en gång infekterat cellen. Spacer-sekvenserna transkriberas och bearbetas till CRISPR-RNAs (crRNAs) som, med hjälp av trans-aktiverande små crRNA (tracrRNA), känner igen specifika sekvenser på det infekterande DNA:t. Med hjälp av Cas-proteiner, som orsakar dubbelsträngsbrott på DNA, kan dessa sekvenser tystas. Detta gör att det främmande DNA:t blir dysfunktionellt och bakterien blir resistent (Hwang *et al.* 2013, van der Oost *et al.* 2014).



Figur 2 – Övergripande mekanism över CRISPR-Cas försvarssystemet hos bakterier. Figuren visar en bakterie som blir infekterad av en bakteriofag. Bakteriens CRISPR-lokus transkriberas och bearbetas till crRNA, som med hjälp av tracrRNA känner igen en specifik sekvens på bakteriofagens DNA. Cas-proteiner möjliggör degradering av det främmande DNA:t. Omritad efter van der Oost *et al.* (2014).

Ett annat försvarssystem som finns naturligt hos både prokaryoter och eukaryoter är antimikrobiella peptider (Chen & Luo 2009). Peptiderna fungerar som ett medfött immunförsvar mot nästan alla levande organismer; gram-positiva och gram-negativa bakterier, protozoer, svampar och även vissa utvecklade virus (Gordon *et al.* 2005, Li *et al.* 2014). Senare i denna rapport fokuseras det dock inte på antimikrobiella peptider i sin helhet, utan främst på dem som angriper bakterier – de antibakteriella peptiderna.

Bakteriofager som ett alternativ till antibiotika

Att använda bakteriofager för att ersätta ineffektiva antibiotika har på senare tid blivit populärt att forska på, och man har redan konstaterat att det är möjligt att använda bakteriofager som ett alternativ till antibiotika. Men på vilka olika sätt har man provat att använda dem? I denna rapport redovisas flertalet studier, samtliga med syftet att bekämpa multiresistenta bakterier, där man på olika sätt har involverat bakteriofager (Doolittle *et al.* 1996, Tait *et al.* 2002, Bikard *et al.* 2014, Citorik *et al.* 2014, Chan *et al.* 2016). En del av dessa försök innefattar en kombinationsbehandling med antibiotika, medan andra har uteslutit antibiotika helt. Nedan redovisas tre appliceringsområden; bakteriofager som angriper biofilmer, bakteriofager som hämmar pumpar i bakteriens cellmembran samt bakteriofager som laddats med CRISPR-sekvenser. Några negativa aspekter med bakteriofager som ersättning till antibiotika diskuteras också.

Bakteriofager som angriper biofilmer

En fördel bakteriofager har framför antibiotika är att de attackerar biofilmer bättre (Whitchurch *et al.* 2002). Faktum är att bakteriofager i många fall föredrar att angripa en biofilm av bakterier framför flytande kulturer där bakterierna är mindre tillgängliga (Tait *et al.* 2002). Biofilmer bildas ofta av multiresistenta bakterier i kroppen, vilket innebär att en grupp av bakterier strukturerats tillsammans och fäster till en levande yta (Whitchurch *et al.* 2002). Bakterier som ofta bildar biofilmer är *Pseudomonas aeruginosa* (kan leda till bland annat kroniska lunginfektioner samt hudinfektioner) och *Acinetobacter baumannii* (leder till bland annat sårinfektioner och sjukhusförvärvade lunginflammationer då bakterien lätt fäster sig till och koloniserar icke-levande ytor). Att växa i biofilmer gör bakterierna mindre känsliga för antibiotika (Alves *et al.* 2016, Tseng *et al.* 2016).

Att bakteriofager kan användas för att eliminera biofilmer som bildats av multiresistenta bakterier påvisade Tait och medarbetare (2002). Författarna observerade att det krävs en kombination av tre bakteriofager för att en biofilm bestående av endast en bakterietyp (de använde *Enterobacter cloacae* NCTC 5920) ska utrotas. Denna upptäckt är viktig, i och med att *E. cloacae* ofta leder till infektioner i blodomloppet, vilka kan vara väldigt allvarliga (Krzyminska *et al.* 2010). Om en biofilm består av flera bakterietyper (Tait med kollegor (2002) använde *Enterobacter agglomerans*, vilken kan orsaka nedsättningar i lungfunktioner, utöver *E. cloacae* NCTC 5920) är det dock svårare för bakteriofagerna att bekämpa biofilmen (Wang & Cole 1996, Tait *et al*. 2002). Man skulle kunna använda bakteriofager för att kontrollera biofilmens tillväxt, men inte för att utrota den helt. Enligt Tait och medarbetare (2002) skulle bekämpning av mixade biofilmer med hjälp av bakteriofager vara väldigt komplicerad och fungera dåligt.

Doolittle med kollegor (1996) gjorde en liknande studie som Tait och medarbetare (2002), fast då istället på bakterierna *Escherichia coli* (kan orsaka urinvägsinfektioner och diarrésjukdomar) och *P. aeruginosa* (Cassels & Wolf 1995, Doolittle *et al.* 1996). Två arter av bakteriofager (kallade E79 och T4) användes i försöket, och dessa modifierades ibland även till varianter. Genom att tillverka biofilmer i olika tjocklekar av respektive bakteriestam och sedan injicera bakteriofager till dem, bestämdes bakteriofagernas effektivitet att angripa bakterielagren. Bakteriofagen E79 visade sig ha svårigheter att angripa de tjockare biofilmerna av *P. aeruginosa*, då den bara infekterade cellerna på ytan och inte lagren längst in i biofilmen. E79 hade däremot betydligt enklare att angripa en tunnare biofilm, där den infekterade majoriteten av cellerna. När bakteriofagen T4 tillsattes till biofilmer av *E. coli* blev många av cellerna ljust vita. Enligt Doolittle med kollegor (1996) tyder detta på att

bakteriofagens DNA har injicerats i dessa celler, vilket alltså innebär att bakteriofagerna lyckades infektera cellerna.

Bakteriofager som hämmar pumpar i bakteriens cellmembran
Chan och medarbetare (2016) konstaterade att bakteriofager kan användas för att hämma olika pumpar som finns i multiresistenta bakteriers cellmembran. Dessa pumpar har upptäckts i bland annat *P. aeruginosa*, där de ansvarar för att transportera ut eventuell antibiotika som finns i cellen. Detta gör att bakterier kan överleva trots att antibiotika finns presenterade i miljön. Transporten av antibiotika är aktiv och kräver därmed energi i form av till exempel ATP. Pumparna ingår i det så kallade Mex-systemet (Multi-drug efflux system), vilket innefattar tre olika komponenter – en transporterande antiport (transportprotein varigenom en molekyls transport ger upphov till co-transport av en annan molekyl åt motsatt håll; exempelvis MexB), ett protein som sitter på cellens yttermembran och bildar kanaler som exponeras på ytan (t.ex. OprM) och ett protein som orsakar fusion av membranet (t.ex. MexA). MexA kopplar samman antiporten och proteinet på yttermembranet. Detta Mex-system är en stor bidragande faktor till antibiotikaresistens. Viktigt att påpeka är dock att Mex-systemet inte behöver orsaka antibiotikaresistens på egen hand, utan kan bidra till resistens i kombination med till exempel mutationer i den genetiska informationen (Chan *et al.* 2016).

Hypotesen som Chan med kollegor (2016) hade var att bakteriofagerna binder till proteinerna som finns exponerade på ytan (OprM) hos två stammar av *P. aeruginosa*. I sådant fall kommer pumparna att fungera sämre och antibiotikumet som lyckats ta sig in i cellen kan därmed inte transporteras ut, vilket i sin tur leder till att bakterierna dör. Selektion skulle alltså ske så att bakterierna som är resistenta mot bakteriofager skulle överleva, och till slut domineras populationen av bakterier med bakteriofagresistens. Under bakteriernas utveckling sker dock en genetisk övervägning (trade-off), vilket innebär att om en organism erhåller en egenskap som ökar dess fitness kommer en annan egenskap att försämras. En bakterie som blir resistent mot bakteriofager kommer därmed istället att vara känslig mot antibiotika. Detta sker som följd av att Mex-systemets mekanism förändras då bakteriofagresistens uppnås. Bakteriofager skulle kunna användas på detta sätt och leda till positiv effekt oavsett resistens (Chan *et al.* 2016).

Experimentet av Chan och medarbetare (2016) innefattade också så kallade knock-out mutanter av Mex-systemets OprM-del, vilket innebär att man slagit ut specifika gener. En OprM-mutant saknar det exponerade OprM-proteinet på cellmembranets yta. Detta leder till att bakteriofagen troligtvis inte kan infektera bakteriecellen, eftersom bakteriofagerna tros binda till just detta protein. Detta gjorde författarna för att ta reda på vilka av de totalt 42 använda bakteriofagerna som kunde infektera de bakteriella mutanterna. Författarnas hypotes var att OprM-mutanterna skulle vara resistenta mot bakteriofagerna, då de inte skulle kunna binda till cellen. De anade också att dessa celler skulle dö på grund av den trade-off som sker och gör bakterierna känsligare mot antibiotika (Chan *et al.* 2016).

Enligt Chan med kollegor (2016) visade det sig att de bakterier som hade ett funktionellt OprM-protein kunde infekteras av samtliga bakteriofager, och detta ledde till att bakterierna dog. Bakteriestammen som hade OprM-genen utslagen uppvisade resistens mot en av de testade bakteriofagerna (av totalt 42 stycken), vilket kan förklaras av att bakteriofagen inte kunde binda till bakteriens Mex-system på ytan. OprM-mutanten var som förväntat känsligare mot samtliga testade antibiotika (Ceftazidim, Ciprofloxacin, Tetracyklin och Erytromycin), vilket tyder på att den genetiska övervägningen mellan bakteriofag- eller antibiotikaresistens

har skett. Sammanfattningsvis leder bakteriofagresistens till en större känslighet mot antibiotika vars in-/utflöde kontrolleras genom Mex-systemet (Chan *et al.* 2016).

Bakteriofager som laddats med CRISPR-sekvenser
I en studie av Citorik och medarbetare (2014) producerade författarna bakteriofager som laddats med speciella CRISPR-sekvenser, så kallade RNA-guidade DNA-sekvenser (RGNs). Bakteriofagerna var menade att överlämna dessa RGNs till de celler som skulle skyddas från infektion. I cellerna kan dessa RGNs orsaka dubbelsträngsbrott på främmande DNA med hög specificitet. I denna studie hade författarna programmerat RGN-sekvenserna så att de skulle attackera och förstöra de infekterande bakterier vars DNA hade att göra med virulens eller antibiotikaresistens. Detta gav i sin tur upphov till att de resistenta bakterierna dog och selekterade därmed för de bakterier som var känsliga mot antibiotika. Genom RGNs blev samtliga bakterier i populationen så småningom åter känsliga mot antibiotika, vilket gav möjligheten att behandla med antibiotika för att bekämpa dessa multiresistenta bakterier (Citorik *et al.* 2014).

Knappt en månad efter att Citorik med kollegor (2014) hade publicerat sin studie, publicerades en liknande studie av Bikard och medarbetare (2014). Bikard och medarbetare (2014) levererade RGNs via bakteriofager till celler som infekterades med *S. aureus*. Dessa CRISPR-sekvenser innehöll en gen som kodade för ett Cas-protein, vilket klipper speciella sekvenser på främmande DNA (Figur 2). Cas-proteinerna var programmerade så att de skador som skulle orsakas på kromosomen av *S. aureus* inte skulle kunna repareras, vilket skulle leda till att bakterierna dog. Resultatet visade att dessa antimikrobiella medel som innefattar CRISPR-Cas aktivitet bara dödar en viss del av bakteriepopulationen, och en kombinerad behandling med antibiotika måste ske för att utrota samtliga bakterier och därmed bota infektionen (Bikard *et al.* 2014).

Negativa aspekter med bakteriofager som ersättning till antibiotika
En negativ konsekvens med att använda bakteriofager som ersättning till antibiotika är att resistens kan utvecklas hos bakterierna, genom exempelvis CRISPR-Cas systemet. Bakteriofagerna kan också bära på till exempel resistensgener som kan överföras mellan bakterier genom transduktion (vilket innebär att bakteriellt DNA har tagits upp av bakteriofagen som för DNA:t vidare genom att infektera ytterligare bakterier). Transduktion är vanligare bland bakteriofager som infekterar bakterierna lysogeniskt (innebär att de kan ligga vilandes i bakterien om det till exempel finns för lite näring närvarande). För att undvika genöverföring används bara bakteriofager som lyserar cellerna (infekterar och dödar dem direkt). Dessa bakteriofager orsakar dock också problem ibland, eftersom deras snabba lysering kan leda till att bland annat endotoxiner frigörs. Dessa toxiner kan inducera inflammatoriska responser som kan ha allvarliga sidoeffekter. (Nobrega *et al.* 2015)

Bakgrundsfakta om antibakteriella peptider

Antibakteriella peptider är proteiner som fungerar som försvarsmekanismer i celler genom att agera som gifter. De upptäcktes på 1920-talet, men började inte forskas ordentligt på förrän på 1980-talet då man kom på att de kanske kan användas som läkemedel (Tam *et al.* 2002, Chen & Luo 2009). Antibakteriella peptider har dock existerat som ett försvar i celler mycket längre än så, närmare 2,6 miljarder år (Gordon *et al.* 2005). Sedan man upptäckte dem har man isolerat och karaktäriserat hundratals peptider med en antibakteriell verkan (Moghaddam *et al.* 2014, Azmi *et al.* 2015).

Antibakteriella peptider finns i många olika organismer (växter, djur och svampar), däribland människan (Reardon 2015). Exempel på denna typ av peptid i människan är defensins och cathelicidin, vilka finns i cellernas leukocyter (de vita blodkropparna). De sekreteras också i vissa hud- och muskelytor, samt på ögonen. Där har peptiderna en antibakteriell verkan, men de spelar också en stor roll i inflammationer där de aktiverar immunförsvaret och läker skador (Gordon *et al.* 2005).

Oavsett vilken organism antibakteriella peptider existerar i, syntetiseras de precis som andra proteiner med hjälp av ribosomer i cellen. Ribosomerna översätter olika geners kodon till aminosyror och på så sätt bildas peptider av olika storlek. De långa varianterna av de antibakteriella peptiderna kan bestå av över 100 aminosyror, medan de kortare varianterna oftast är mellan 12 och 50 aminosyror långa (Chen & Luo 2009, Moghaddam *et al.* 2014). Vilken storlek en peptid har påverkar hur den kommer att angripa en infekterande bakterie. Långa peptider är ofta nedbrytande enzymer eller attackerande mot vissa mikrobiella makromolekyler. Små peptider däremot, agerar genom att interagera med energimolekylen ATP eller inhibera olika enzymer. De kan också ändra strukturen eller funktionen av bakteriens cellmembran. Då antibakteriella peptider oftast förekommer som den kortare varianten är cellmembranet det vanligaste stället som angrips i en bakterie (Moghaddam *et al.* 2014).

Som nämnt ovan, är det vanligast att antibakteriella peptider angriper cellmembranet på den infekterande bakterien. I och med att cellmembranets grunduppbyggnad är densamma bland bakterier kan de antibakteriella peptiderna agera som försvarsmolekyler mot flera olika typer av bakteriestammar. Membranets specifika egenskaper har ingen större betydelse. Interaktionen mellan peptid och membran underlättas då peptiderna ofta är positivt laddade och membranet består av negativt laddade delar (attraktion sker mellan positiva och negativa laddningar) (Azmi *et al.* 2015). Peptiderna består också ofta av hydrofoba regioner, vilket särskilt underlättar interaktionen i och med att membranet är hydrofobt. Ytterligare en förstärkande faktor är att peptiderna kan ändra konformation, så att de laddade/hydrofoba regionerna separeras från varandra. På så sätt kan peptiden interagera med membranet på flera olika ställen samtidigt. Interaktion sker inte bara till de negativt laddade delarna på membranet, utan också till andra delar. Den något ovanligare varianten är att peptiderna direkt angriper membranets beståndsdelar (lipider) innan de bildat ett membran, och orsakar på så sätt cellskada (Moghaddam *et al.* 2014). Förståelsen för hur dessa interaktioner går till på detaljnivå är dock ofullständig och behöver utforskas ytterligare (Gordon *et al.* 2005).

Man har kommit fram till att antibakteriella peptider skulle kunna agera som alternativ till antibiotika, då man inte har sett att bakterier utvecklat någon resistens mot dem (Chen & Luo 2009). Man skulle i sådant fall tillverka peptiderna syntetiskt och ge dem som ett läkemedel till personen som infekterats med multiresistenta bakterier. Antibakteriella peptider har ingen begränsning med tanke på vad de attackerar och har därmed ett brett aktivitets-spektrum (Moghaddam *et al.* 2014, Azmi *et al.* 2015). Tidigare har man sett att de kan agera som försvar mot både animaliska och mänskliga sjukdomar genom att bryta ned bakterierna. De har också visat sig ha aktiviteter mot cancer- och tumörceller (Chen & Luo 2009). Enligt Moghaddam och medarbetare (2014) är antibakteriella peptider ett av de bästa nya alternativen till antibiotika. Användningen av antibakteriella peptider kan också kombineras med antibiotikabehandling (Gordon *et al.* 2005).

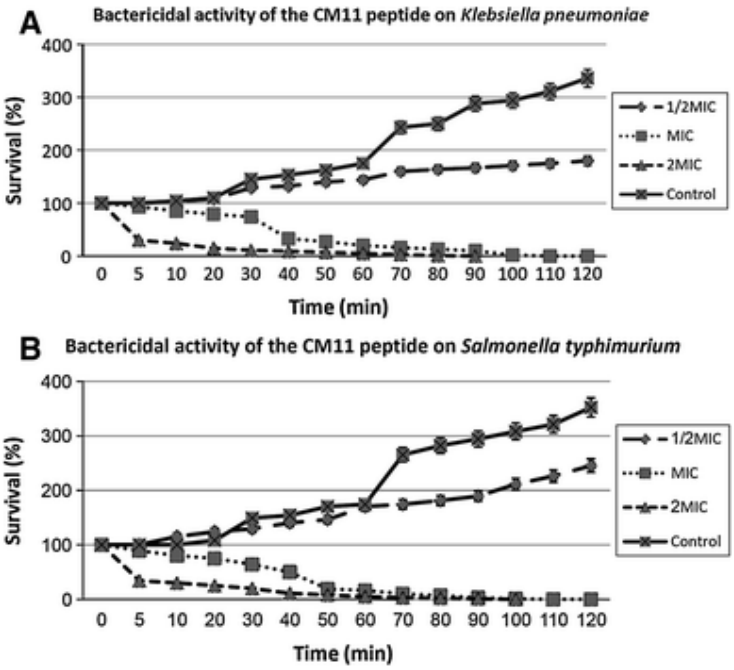
Antibakteriella peptider som ett alternativ till antibiotika

Sedan man började forska på antibakteriella peptider på 1980-talet har man undersökt den antibakteriella aktiviteten hos olika typer av antibakteriella peptider. I denna rapport fokuseras det på den antibakteriella peptiden CM11, lipopeptider och prolinrika peptider (PrAMPs). Kan man isolera och använda dessa peptider för att bekämpa patogena multiresistenta bakterier? Även några negativa aspekter med antibakteriella peptider som ersättning till antibiotika finns redovisade nedan.

Den antibakteriella peptiden CM11

Antibakteriella peptider är ursprungligen framtagna från levande organismer, till exempel reptiler (Azmi *et al.* 2015, Reardon 2015). Den mest välstuderade peptiden är en syntetiskt producerad hybrid (kallas CM11) mellan insektspeptiden cecropin och peptiden melittin, vilken agerar som gift i bin (Moghaddam *et al.* 2014). Moghaddam med kollegor (2012) påvisade att CM11 har en antibakteriell verkan mot fem patogena bakterier, nämligen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *A. baumannii* samt *E. coli*. Som tidigare nämnt orsakar dessa bakterier bland annat infektioner i blodomloppet, hud- och sårinfektioner, lunginflammationer och urinvägsinfektioner (Cassels & Wolf 1995, Rao 1998, Tawil *et al.* 2014, Alves *et al.* 2016, Tseng *et al.* 2016). Ytterligare en sjukdom som kan uppstå är kolera, som orsakas av *V. cholerae*. Kolera är en mycket allvarlig sjukdom i tarmarna (Kaper *et al.* 1995). Samtliga dessa bakterier är resistenta mot många antibiotika och är således väldigt svåra att behandla. Att peptiden CM11 har visat sig ha en antibakteriell verkan mot dessa bakterier är därför väldigt positivt, då man har möjlighet att bota många sjukdomar (Moghaddam *et al.* 2012).

I en senare studie av samma forskningsgrupp (Moghaddam *et al.* 2014) undersökte man den antibakteriella aktiviteten hos samma peptid (CM11) mot två andra patogena bakterier – *Klebsiella pneumoniae* och *Salmonella typhimurium*. *K. pneumoniae* leder till sjukdomar som lunginflammation eller infektioner i urinvägarna. *S. typhimurium* orsakar diarré och en sjukdom som kallas Tyfoidfeber. Båda dessa bakteriestammar är resistenta mot en rad olika antibiotika, vilket gör dem väldigt svårbehandlade. Faktum är att *K. pneumoniae* till och med är resistent mot Carbapenem (antibiotikumet man har sparat som sista behandlingsalternativ). I experimentet isolerade man fram de bakterier av dessa stammar som visade sig vara mest resistenta mot antibiotika. Sedan tillsattes CM11 i olika koncentrationer (ingen, låg, medel och hög) till de båda bakteriestammarna. Genom att mäta antalet överlevande bakterier vid ett flertal tillfällen kunde bakterieantalet följas med tiden (Figur 3) (Moghaddam *et al.* 2014).



Figur 3 – Andelen överlevande bakterier med tiden då peptiden CM11 har tillsatts i olika koncentrationer (låg koncentration = 1/2MIC; medel koncentration = MIC; hög koncentration = 2MIC). Även kontroller där ingen peptid tillsatts redovisas. Figuren visar den antibakteriella aktiviteten hos CM11 mot **A)** *K. pneumoniae* och **B)** *S. typhimurium*. Figuren används med tillåtelse från Springer.

Figur 3 visar att antalet bakterier efter cirka en timme hade ökat med ungefär 200 % i de prov där ingen peptid tillsatts (både för *K. pneumoniae* och *S. typhimurium*). I proven där olika koncentrationer av CM11 hade adderats var bakterieantalet färre. Den lägsta koncentrationen av CM11 visade sig inte vara tillräcklig för att utrota bakteriestammen utan där sågs bakterieantalet fortfarande öka, men inte i lika stor utsträckning som kontrollprovet. Den mellersta och högsta koncentrationen av CM11 visade sig dock vara mycket effektiva, och i princip samtliga bakterier hade dödats efter ungefär en timme (Figur 3). Detta påvisar att peptiden CM11 har en tydlig antibakteriell verkan (Moghaddam *et al.* 2014).

Moghaddam och medarbetare (2014) inkluderade också test av den antibakteriella peptidens cytotoxicitet på olika typer av eukaryota celler. Om peptiden är cytotoxisk innebär det att den kan orsaka skador på andra celler än de patogena bakterierna. Anledningen till att detta undersöktes var för att studera säkerheten i att använda CM11 som ett läkemedel i kroppen, där det naturligtvis finns andra celler än de infekterande bakterierna. Cytotoxiciteten undersöktes på tre olika typer av människoceller (från livmodern, prostatan och lymfoblaster (en typ av lymfocyt)). Ytterligare två eukaryota celler användes i försöket – celler från mjälten i mus samt celler från äggstockarna i hamster. Det visade sig att låga koncentrationer (3-6 μg/mL) av den antibakteriella peptiden överlag inte påverkade de eukaryota cellerna märkvärt. Den enda celltypen som stack ut var den från människans prostata, vilken överlevde i lägre kvantitet än de övriga cellerna även vid liten tillsats av peptiden. Högre koncentrationer (uppåt 24 μg/mL) innebar allt som oftast cytotoxicitet (Moghaddam *et al.* 2014).

Lipopeptider

Azmi med kollegor (2015) använde sig istället av ett antal olika lipopeptider, vilka består av en hög halt av lipider (fetter). Författarna undersökte deras antibakteriella aktivitet mot sex typer av bakteriestammar. Man använde sig av tre gram-positiva bakteriestammar (*S. aureus*, *S. epidermidis* och *B. subtilis*) och tre gram-negativa stammar (*E. coli*, *K. pneumoniae* och *P. aeruginosa*). Resultaten visade att ingen av de testade peptiderna hade en antibakteriell verkan mot de gram-negativa bakterierna. Fyra peptider visade dock en lovande antibakteriell verkan mot de gram-positiva bakterierna. Vidare testades lipopeptidernas aktivitet mot ett bredare spektrum av multiresistenta gram-positiva bakterier. Denna gång visade tre av lipopeptiderna en antibakteriell verkan – samtliga tre inkluderade i de som tidigare visat en aktivitet mot gram-positiva bakterier. Dessa tre peptiders cytotoxicitet undersöktes också i detta försök, och då använde man sig av både tumörceller och normala (icke-tumör) celler från människa. Två lipopeptider visade måttlig cytotoxicitet, medan en visade en liten cytotoxicitet (Azmi *et al.* 2015).

Prolinrika peptider – PrAMPs

Antibakteriella peptider som innehåller en hög halt av aminosyran Prolin kallas PrAMPs (Gagnon *et al.* 2016). Dessa peptider är ofta korta och innehåller 18-20 aminosyror (Seefeldt *et al.* 2015). PrAMPs attackerar, till skillnad från tidigare nämnda peptider som angriper cellmembranet, ribosomen i den infekterande bakterien. Detta liknar hur många antibiotika attackerar bakterier (Gagnon *et al.* 2016). Det var just PrAMPs som Gagnon och medarbetare (2016) fokuserade på. Författarna testade sju olika typer av PrAMPs mot två varianter av *E. coli* (*E. coli* SQ110 samt *E. coli* SQ110 LPTD, vilken är defekt i yttermembranet). Studien visade att fem av sju peptider hade en antibakteriell verkan, och en lägre koncentration behövde tillsättas till de bakterier som hade en defekt i yttermembranet. Detta tyder på att det är en utmaning för peptiderna att passera membranet (Gagnon *et al.* 2016).

Negativa aspekter med antibakteriella peptider som ersättning till antibiotika
Enligt Moghaddam med kollegor (2014) kan antibakteriella peptider leda till sidoeffekter såsom toxicitet, vilket ses som ett stort problem. Exempel på detta är att de leder till cytotoxicitet, som nämnt ovan i två av studierna (Moghaddam *et al.* 2014, Azmi *et al.* 2015). Antibakteriella peptider är också dyra att framställa och utforska, vilket kan begränsa forskningen kring dem. Ytterligare en negativ aspekt med antibakteriella peptider är att aktiviteten tros minska i till exempel miljöer med hög saltkoncentration eller högt pH-värde. Detta eftersom vissa peptider är salt- och pH-känsliga. Man har dessutom sett att allergi har uppstått efter upprepad applicering av peptiderna (Gordon *et al.* 2005).

Diskussion

Antibiotikaresistens har blivit ett stort och allvarligt problem i såväl dagens som framtidens samhälle, då det blir besvärligt att behandla de infektioner som orsakas av resistenta bakterier. Vi människor har inom loppet av 100 år lyckats upptäcka antibiotika och modifiera fram nya antibiotika, för att sedan använda dem på ett sådant sätt att bakterier utvecklat resistens mot majoriteten av dem. Detta drabbar inte bara oss människor, utan även djur som vi håller för livsmedelsproduktion. På sistone har det dock hittats alternativa behandlingsmetoder, däribland innefattande bakteriofager och antibakteriella peptider.

Både vad gäller bakteriofager och antibakteriella peptider har man bara skrapat på ytan av all information som tros finnas. Hittills har bakteriofager visat sig kunna användas på fler sätt än antibakteriella peptider, troligtvis för att man har forskat i större utsträckning på bakteriofager. Finns det några för- eller nackdelar med de olika användningsområdena för bakteriofager? När ska man använda vilken metod? Vad det gäller de antibakteriella peptiderna är det väldigt få peptider som hittills har prövats kliniskt (på grund av bristande forskning), men fler är på väg att utforskas (Gordon *et al.* 2005). Samtliga antibakteriella peptider som nämnts i denna rapport (CM11, lipopeptider och PrAMPs) har visat sig kunna utrota infektionsorsakande multiresistenta bakterier. De olika typerna används dock vid olika tillfällen, vilka diskuteras nedan.

Vid vilka tillfällen kan man använda bakteriofagens olika appliceringsområden?
Även om bakteriofager har observerats angripa biofilmer, verkar det ibland som att det inte är den mest optimala behandlingsmetoden för att bekämpa multiresistenta bakterier som växer i biofilmer. Enligt Tait och medarbetare (2002) är det svårt för bakteriofager att helt utrota en biofilm bestående av en kombination av flera bakteriestammar (vilket ofta är fallet i en naturlig miljö). Dessutom påvisade Doolittle med kollegor (1996) att det är svårt för dem att angripa tjockare biofilmer.

Tait och medarbetare (2002) anser att bakteriofager som angriper biofilmer möjligen kan användas för att kontrollera biofilmers storlek, snarare än att utrota dem helt. Ett alternativ är att använda bakteriofagerna som ett komplement till en annan primär behandlingsmetod. Genom att tillsätta en mix av olika bakteriofager till biofilmen kanske tillväxten kan kontrolleras ännu bättre. Kanske kan till och med fullständig utrotning av biofilmen uppnås, trots att den är tjock eller består av flera olika multiresistenta bakterier.

Ett användningsområde för bakteriofagerna som hittills verkar användbart är det som beskrivs av Chan med kollegor (2016), där bakteriofager används för att hämma Mex-systemet hos bakterier. I denna metod kan antibiotika användas om bakterien utvecklar resistens mot bakteriofagerna, med tanke på den trade-off som sker. Om bakteriofagresistens inträffar kan

man använda antibiotika som bakterien tidigare utvecklat en resistens mot. På så sätt förlängs den effektiva livslängden av de antibiotika som finns på marknaden idag, och spektrumet för vilka bakterier dessa antibiotika kan användas på breddas (Chan *et al.* 2016). Vid tillfällen där man vill bekämpa bakteriestammar som har detta Mex-system kan man använda sig av bakteriofager som angriper just Mex-systemet. I dagsläget har det dock inte forskat särskilt mycket på dessa typer av bakteriofager, men den information som hittills erhållits tyder på en ljus framtid där bakteriofager skulle kunna fungera som läkemedel för att bota infektioner orsakade av bakterier bestående av detta Mex-system.

Ett av de största problemen med att använda bakteriofager som ett alternativ till antibiotika är bakteriens CRISPR-Cas system (Chan *et al.* 2016). Finns det något sätt att undgå detta försvarssystem? I och med att man levererar en CRISPR-sekvens via bakteriofager som laddats med RGNs förutsätter det att man känner till vilka sekvenser som finns i bakteriens CRISPR-lokus. På så sätt kan man undvika att bakteriofagens DNA eller sekvensen som levereras innehåller en kort sekvens som finns lagrad i CRISPR-lokuset, vilket skulle innebära eliminering. Med denna kännedom tänker jag mig att det finns möjlighet att kringgå CRISPR-Cas systemet, genom att exempelvis modifiera bakteriofagens DNA så att det inte längre känns igen av bakterien.

Vid vilka tillfällen skulle man kunna använda antibakteriella peptider som läkemedel?
Enligt Azmi och medarbetare (2015) visade tre av de testade lipopeptiderna prov på en god antibakteriell verkan mot en rad olika gram-positiva bakterier. Då en infektion har orsakats av gram-positiva bakterier kan man tänka sig att detta är en behandlingsmetod värd att satsa på.

Den främsta negativa aspekten med antibakteriella peptider är att de anses kunna vara cytotoxiska. Detta är man mycket medveten om, och i två av studierna nämna i denna rapport (Moghaddam *et al.* 2014, Azmi *et al.* 2015) har man till och med inkluderat tester av peptidernas cytotoxicitet. Både CM11 och lipopeptiderna visade sig ha måttlig samt liten cytotoxicitet. CM11 skadade de eukaryota cellerna då en hög koncentration av peptiden tillsattes, men betydligt mindre vid låga koncentrationer. I de fall där den låga koncentrationen är tillräckligt stor för att bekämpa de patogena bakterierna bör CM11 kunna vara ett gott medel för att ersätta antibiotika i framtiden. Problemet med cytotoxicitet skulle möjligtvis kunna undvikas genom att utnyttja till exempel DNA-origami, vilket fungerar som en 3D-kapsel av DNA som omsluter den antibakteriella peptiden. Kapseln öppnas inte förrän målet har nåtts och på så sätt minskar risken att andra celler skadas (Andersen *et al.* 2009).

I och med att PrAMPs angriper ribosomen inuti cellen måste de ta sig över cellmembranet på något sätt. Detta görs genom transport via specialiserade transportörer som är väldigt ovanliga i eukaryota celler. Därför anses de generellt sett vara ogiftiga (Seefeldt *et al.* 2015). Detta är unikt för PrAMPs om man jämför med CM11 och lipopeptiderna, med tanke på deras eventuella cytotoxiska effekt (Moghaddam *et al.* 2014, Azmi *et al.* 2015). I och med att PrAMPs inte ses ha en cytotoxisk effekt skulle de kunna användas som väldigt bra antibakteriella medel. Man har dessutom kunnat se att vissa PrAMPs kan passera blod-hjärnbarriären för att attackera specifika hjärnceller, vilket gör att dessa peptider även kan användas för att potentiellt bota infektioner i hjärnan. En förutsättning är då att man säkerställt att just dessa PrAMPs inte är cytotoxiska (även om de generellt sett inte är det), eftersom skador på andra celler i hjärnan kan leda till allvarliga konsekvenser. Alternativt kan peptiderna möjligen användas som transportörer till andra läkemedel som verkar i hjärnan (Seefeldt *et al.* 2015).

PrAMPs visade sig också döda bakterier med defekta membran i en större utsträckning än bakterier med intakta membran, vilket tyder på att membranet är en barriär som är svår att ta sig över för en peptid (Gagnon *et al.* 2016). Man kan därför tänka sig att man skulle kunna använda PrAMPs i kombination med något annat medel som orsakar membranskador på de multiresistenta bakterierna. På så sätt bör det vara lättare för PrAMPs att angripa och döda bakteriecellerna.

Hur ser det ut för bakteriofager och antibakteriella peptider i framtiden?
Överlag ser det ljust ut för bakteriofager och antibakteriella peptider att ersätta antibiotika i framtiden, eller att fungera som ett komplement till antibiotika. I och med att man har sett att bakterier har försvarssystem mot bakteriofager, men inte mot antibakteriella peptider, tyder detta på att vi kanske bör fokusera på de antibakteriella peptiderna. Enligt Gordon med kollegor (2005) har man hittills forskat för lite på antibakteriella peptider för att kunna säga att det är helt otänkbart att man skulle kunna använda dem som läkemedel. Ytterligare kunskap behövs angående bland annat antibakteriella peptiders lagringstid, baserat på deras kemiska stabilitet (Gordon *et al.* 2005).

Ett alternativ till att fokusera på de antibakteriella peptiderna skulle kunna vara att fokusera på de metoder där man kan kringgå bakteriofagresistens. Med tanke på att evolutionen ständigt pågår och inte har något mål eller avslut, kommer både bakterier och bakteriofager att förändras med tiden. Bakteriofager kommer att modifieras och till slut kanske de kommer kunna infektera bakterier som de tidigare inte kunnat på grund av resistens. På samma sätt kommer bakterier ständigt att utveckla nya resistenser. Naturen fungerar på detta sätt. Oavsett vad vi hittar för alternativa botemedel till multiresistenta bakterier, tror jag att möjligheten alltid finns för att nya resistenser kan utvecklas. Menar jag att det i framtiden kommer att vara svårt att finna nya metoder för att behandla dessa sjukdomar? Det är mycket möjligt, men jag tror snarare att evolutionen kommer att leda till ännu fler möjligheter. Vi kommer troligtvis inte kunna använda bakteriofagerna på det sätt vi gör idag (på grund av mutationer), men framtidens bakteriofager kan sannolikt användas på helt andra sätt.

Reflektioner
Kan man tänka sig att vi bör fokusera på hela andra metoder – det kanske inte är bakteriofager och antibakteriella peptider som är framtidens läkemedel? Absolut, det är tänkbart. Kanske ska man fokusera på behandlingsmetoder som inte ens är upptäckta idag, till exempel bakteriofager som angriper bakterier genom att mutera dem. Mutationen skulle i sådant fall innebära borttagning eller förstörelse av en gen som kodar för en viss antibiotikaresistens, vilket skulle göra bakterien åter känslig mot antibiotikumet. Med hjälp av antibiotika skulle man senare kunna utrota bakteriestammen. En annan metod jag kan tänka mig dominera i framtiden är att man utvecklar vaccin mot sjukdomar orsakade av multiresistenta bakterier.

Tack

Tack till Magnus Eklund som gett mig återkoppling och konstruktiv kritik. Även tack till Ida Isolehto och Björn Greijer som hjälpt mig genom resan med bra kommentarer. Slutligen stort tack till Oliver Nordvall som stöttat och hjälpt mig på vägen.

Referenser

Alves DR, Perez-Esteban P, Kot W, Bean JE, Arnot T, Hansen LH, Enright MC, Jenkins ATA. 2016. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. Microbial Biotechnology **9**: 61–74.

Andersen ES, Dong M, Nielsen MM, Jahn K, Subramani R, Mamdouh W, Golas MM, Sander B, Stark H, Oliveira CLP, Pedersen JS, Birkedal V, Besenbacher F, Gothelf KV, Kjems J. 2009. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. Nature **459**: 73-U75.

Azmi F, Elliott AG, Khalil ZG, Hussein WM, Kavanagh A, Huang JX, Quezada M, Blaskovich MAT, Capon RJ, Cooper MA, Skwarczynski M, Toth I. 2015. Self-assembling lipopeptides with a potent activity against Gram-positive bacteria, including multidrug resistant strains. Nanomedicine **10**: 3359–3371.

Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. 2014. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nature Biotechnology **32**: 1146–1150.

Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. 2005. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City - A new threat to our antibiotic armamentarium. Archives of Internal Medicine **165**: 1430–1435.

Cassels F, Wolf M. 1995. Colonization Factors of Diarrheagenic *Escherichia-Coli* and Their Intestinal Receptors. Journal of Industrial Microbiology **15**: 214–226.

Chan BK, Sistrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports **6**: 26717.

Chen W, Luo L. 2009. Classification of antimicrobial peptide using diversity measure with quadratic discriminant analysis. Journal of Microbiological Methods **78**: 94–96.

Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. 2014. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nature Biotechnology **32**: 1141–1145.

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A meta-analysis. Clinical Infectious Diseases **36**: 53–59.

d'Herelle F. 1917. An invisible antagonist microbe of dysentery bacillus. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences **165**: 373–375.

Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. 1996. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. Journal of Industrial Microbiology **16**: 331–341.

Gagnon MG, Roy RN, Lomakin IB, Florin T, Mankin AS, Steitz TA. 2016. Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. Nucleic Acids Research **44**: 2439–2450.

Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. Current Eye Research **30**: 505–515.

Gould IM. 2007. MRSA bacteraemia. International Journal of Antimicrobial Agents **30**: S66–S70.

Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh J-RJ, Joung JK. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology **31**: 227–229.

Kaper J, Morris J, Levine M. 1995. Cholera. Clinical Microbiology Reviews **8**: 48–86.

Krzyminska S, Koczura R, Mokracka J, Puton T, Kaznowski A. 2010. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. Microbial Pathogenesis **49**: 83–89.

Li W, Tailhades J, O'Brien-Simpson NM, Separovic F, Otvos L, Hossain MA, Wade JD. 2014. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. Amino Acids **46**: 2287–2294.
Lindgren A-K, Gustafsson E, Petersson AC, Melander E. 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mecC: a description of. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **35**: 971–975.
Moghaddam MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Azizi Barjini K, Amani J. 2012. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. Probiotics and Antimicrobial Proteins **4**: 133–139.
Moghaddam MM, Barjini KA, Ramandi MF, Amani J. 2014. Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. World Journal of Microbiology and Biotechnology **30**: 1533–1540.
Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. Trends in Microbiology **23**: 185–191.
Potera C. 2013. PHAGE RENAISSANCE NEW HOPE against ANTIBIOTIC RESISTANCE. Environmental Health Perspectives **121**: A48–A53.
Rao GG. 1998. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. Drugs **55**: 323–330.
Reardon S. 2015. Antibiotic alternatives rev up bacterial arms race. Nature **521**: 402–403.
Seefeldt AC, Nguyen F, Antunes S, Perebaskine N, Graf M, Arenz S, Inampudi KK, Douat C, Guichard G, Wilson DN, Innis CA. 2015. The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. Nature Structural & Molecular Biology **22**: 470-U59.
Tait K, Skillman LC, Sutherland IW. 2002. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. Biofouling **18**: 305–311.
Tam JP, Lu Y-A, Yang J-L. 2002. Antimicrobial dendrimeric peptides: Antimicrobial dendrimeric peptides. European Journal of Biochemistry **269**: 923–932.
Tawil N, Sacher E, Mandeville R, Meunier M. 2014. Bacteriophages: biosensing tools for multi-drug resistant pathogens. Analyst **139**: 1224–1236.
Tseng S-P, Hung W-C, Huang C-Y, Lin Y-S, Chan M-Y, Lu P-L, Lin L, Sheu J-H. 2016. 5-Episinuleptolide Decreases the Expression of the Extracellular Matrix in Early Biofilm Formation of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Marine Drugs **14**: 143.
Twort FW. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. Lancet **2**: 1241–1243.
van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology **12**: 479–492.
Wang Y, Cole RB. 1996. Acid and base hydrolysis of lipid A from *Enterobacter agglomerans* as monitored by electrospray ionization mass spectrometry: Pertinence to detoxification mechanisms. Journal of Mass Spectrometry **31**: 138–149.
Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science **295**: 1487–1487.
Woon S-A, Fisher D. 2016. Antimicrobial agents – optimising the ecological balance. BMC Medicine **14**: 114.

[**Bakteriofager och antibakteriella peptider som ersättning till antibiotika**]: Etisk bilaga

Karin Vickberg

Självständigt arbete i biologi 2016

På grund av felaktig, vårdslös och opassande användning av antibiotika har resistenta bakterier selekterats fram. Som en följd av ytterligare administrering av antibiotika har multiresistenta bakterier bildats (Chan *et al.* 2016). Dessa infektioner är idag mycket svåra att behandla, och man försöker komma på olika alternativa metoder för att bota patienter som blivit smittade med multiresistenta bakterier (Reardon 2015). Det finns dock många risker med att forska på multiresistenta bakterier, då en ytterligare spridning av dem skulle leda till allvarliga konsekvenser. Är det egentligen etiskt rätt att använda multiresistenta bakterier inom forskningen?

Det främsta motargumentet till att det skulle vara etiskt rätt att forska på multiresistenta bakterier är att det kan ske en ytterligare spridning av bakterierna (utöver den som sker naturligt). En ytterligare spridning, t.ex. att bakterier spolas ned i avloppet, skulle kunna leda till att organismer (både människor och djur) blir infekterade. Detta skulle ge allvarliga konsekvenser för både individer och samhället i stort, eftersom fler insjuknar och effektiva botemedel har en begränsad tillgänglighet. Om dessutom antibiotika finns närvarande i t.ex. grundvattnet där dessa bakterier hamnar, kommer resterande bakterier att slås ut (Potera 2013). Denna utslagning kan påverka såväl ekosystemet som normala bakteriefloror. De resistenta bakterierna överlever eftersom miljön selekterar för dessa bakterier, vilket innebär att dessa kommer att öka i antal. Med detta ökar också sannolikheten att infektera ytterligare organismer (Potera 2013). Laborering som skulle orsaka ytterligare spridning av multiresistenta bakterier skulle alltså påverka både människor, djur och ekosystemet negativt. Endast en bakterie som hamnar på fel plats kan orsaka förödande konsekvenser, i och med den snabba generationstiden.

Det starkaste argumentet som talar för att forskningen som innefattar multiresistenta bakterier är etiskt korrekt är att denna forskning är en förutsättning för att alternativa behandlingsmetoder ska kunna utforskas. Dessa behandlingsmetoder gynnar såväl människor som djur. Man har nämligen redan funnit en alternativ metod som innefattar bakteriofager, vilka har visat sig bota infektioner i både människa och djur (Allen *et al.* 2014). Ett annat argument som talar för denna forskning, är att den skulle utöka förståelsen och bredda kunskapsbasen kring multiresistenta bakterier. Detta är viktigt eftersom vetskapen inom vissa områden är bristfällig (Mamhidir *et al.* 2011).

Sammanfattningsvis är forskningen som innefattar multiresistenta bakterier lite som en ond cirkel. Forskas det inte på dessa bakterier kommer inte heller bredare kunskap och nya behandlingsmetoder att uppkomma, men om forskningen förekommer finns risken att bakterierna sprids och orsakar svårbehandlade infektioner. Det skulle vara rättvist för både människor, djur, ekosystemet och samhället om det skulle införas strikta regler och lagar kring hur multiresistenta bakterier ska hanteras. En otroligt viktig del i detta är att forskaren verkligen tar sitt ansvar och följer dessa lagar. Denna forskning är nämligen nödvändig för fortsatt liv på jorden, i och med den naturliga spridning som existerar. Etiskt sett är därför det enda rätta att bedriva forskning som innefattar multiresistenta bakterier, då det i större utsträckning skulle rädda än avsluta liv.

Referenser

Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. 2014. Finding alternatives to antibiotics. I: Bush K (red.). Antimicrobial Therapeutics Reviews: Infectious Diseases of Current and Emerging Concern, s. 91–100. Blackwell Science Publ, Oxford.

Chan BK, Sistrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports **6**: 26717.

Mamhidir A-G, Lindberg M, Larsson R, Fläckman B, Engström M. 2011. Deficient knowledge of multidrug-resistant bacteria and preventive hygiene measures among primary healthcare personnel. Journal of Advanced Nursing **67**: 756–762.

Potera C. 2013. PHAGE RENAISSANCE NEW HOPE against ANTIBIOTIC RESISTANCE. Environmental Health Perspectives **121**: A48–A53.

Reardon S. 2015. Antibiotic alternatives rev up bacterial arms race. Nature **521**: 402–403.